

**Einfluss von PD142893 auf die kontraktile Ansprechbarkeit und
Hypertrophie adulter Kardiomyozyten unter Endothelin-Stimulation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Christoph Arens
aus Olpe**

Gießen 2015

**Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rainer Schulz**

Betreuer: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 15.03.2016

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Herzinsuffizienz.....	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Diagnosestellung	2
1.1.3	Ätiologie, Epidemiologie und zeitlicher Verlauf	3
1.1.4	Kompensationsmechanismen.....	4
1.2	Das Endothelin-System	4
1.2.1	Allgemeines	4
1.2.2	Biosynthese	6
1.2.3	Rezeptoren und deren Antagonisten	6
1.2.4	Plasmakonzentration	8
1.2.5	Signaltransduktion	8
1.2.6	Abbau	9
1.2.7	Physiologische Wirkungen des Endothelins im kardiovaskulären System	10
1.2.8	Pathologische Wirkungen des Endothelins im kardiovaskulären System.....	11
1.2.9	Einfluss des Endothelins auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz	11
1.3	Fragestellung.....	12
2	Material	13
2.1	Chemikalien	13
2.2	Antikörper für Immunoblots	14
2.3	Geräte und Laborbedarf	14
2.3.1	Allgemein verwendete Geräte.....	14
2.3.2	Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände	14
2.4	Software.....	16
2.5	Puffer und Lösungen	16
3	Methoden.....	19
3.1	Isolierung von Herzmuskelzellen	19
3.1.1	Versuchstiere	19
3.1.2	Präparation und Isolierung ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten	19
3.1.3	Vorinkubation der Kulturschalen und Ausplattieren der Kardiomyozyten	21
3.1.4	Inkubation und Kultur der isolierten Kardiomyozyten	21
3.2	Messung der kontraktile Ansprechbarkeit im elektrischen Feld	22
3.2.1	Elektrische Stimulation und Steuerung der Zellverkürzung	22
3.2.2	Messung der Zellverkürzungsparameter	23
3.2.3	Berechnung der Zellverkürzungsparameter	26

3.3	Nachweis der Proteinkinasen p38, JNK und p42/44 im SlotBlot.....	27
3.3.1	Probenvorbereitung	27
3.3.2	Immunologischer Proteinnachweis	27
3.4	Hypertrophieerfassung durch Bestimmung des Zellquerschnitts.....	29
3.5	Statistik	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Akuteffekte von Endothelin und Endothelin plus PD142893 auf die lastfreie Zellverkürzung isolierter Herzmuskelzellen der Ratte	31
4.2	Zeitkinetik der lastfreien Zellverkürzung nach Inkubation mit Endothelin und Endothelin plus PD142893	33
4.3	Effekt von Endothelin und Endothelin plus PD142893 auf Zellbreite, -länge und -volumen sowie auf die MAP-Kinasen p42/p44	35
4.4	Vergleich basaler Zellverkürzungs- und Zellgrößenparameter unter Normoglykämie und -tension mit Modellen der Hyperglykämie und chronischen Hypertension.....	37
4.5	Endothelin- und PD142893-abhängige Veränderungen der Zellverkürzung, Zellgröße und MAPK-Aktivierung in SHR-Kardiomyozyten.....	40
4.6	Einfluss von Hyperglykämie auf die Endothelin- und PD142893-abhängigen Veränderungen der Zellverkürzung, Zellgröße und MAPK-Aktivierung	44
5	Diskussion.....	48
5.1	Hauptbefunde	49
5.2	Endothelin steigert im Akutexperiment über ET _A /ET _{B1} konzentrationsabhängig die lastfreie Zellverkürzung	49
5.3	Endothelin verursacht einen zeitabhängigen, kardiodepressiven Effekt via einer ET _{B2} -Rezeptor-abhängigen Aktivierung des JNK-Signalwegs.....	50
5.4	Endothelin verursacht einen prohypertrophen Effekt via einer ET _A /ET _{B1} -Rezeptor-abhängigen Aktivierung des p42/44-Signalwegs und zeigt über ET _{B2} auch negativ hypertrophe Effekte 51	
5.5	Endothelin und PD142893 zeigen unter anderem aufgrund modifizierten Rezeptorenkopplungen an SHR-Kardiomyozyten weder Effekte in der lastfreien Zellverkürzung, noch bei den Zellgrößenparametern.....	52
5.6	Endothelin und PD142893 zeigen unter Hyperglykämie unter anderem aufgrund modifizierter Rezeptorenkopplung Effekte in der lastfreien Zellverkürzung, jedoch nicht bei den Zellgrößenparametern	54
6	Zusammenfassung.....	57
7	Summary	58
8	Abkürzungsverzeichnis	59
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	61
9.1	Abbildungsverzeichnis	61

Inhaltsverzeichnis

9.2	Tabellenverzeichnis.....	62
10	Literaturverzeichnis.....	63
11	Anhang	78
11.1	Übersicht über mögliche Ätiologien der Herzinsuffizienz.....	78
12	Publikationsverzeichnis	80
13	Ehrenwörtliche Erklärung.....	82
14	Danksagung	83

1 Einleitung

1.1 Die Herzinsuffizienz

1.1.1 Definition

Laut den aktuellen ESC-Guidelines von 2012 wird die Herzinsuffizienz pathophysiologisch definiert als eine "Abnormalität der kardialen Struktur oder Funktion, welche zu einem Herzversagen führt, so dass das Herz trotz normaler Füllungsdrücke nicht mehr dazu in der Lage ist, angemessene Mengen an Sauerstoff für die Bedürfnisse des metabolisierenden Gewebes bereitzustellen" [1]. Genau genommen handelt es sich hierbei jedoch nur um die Definition der systolischen Herzinsuffizienz (s.u.).

Neben diesem pathophysiologischen Ansatz existiert auch eine klinische Definition anhand einer Syndrombeschreibung, die die Symptome und Befunde des Patienten in den Vordergrund stellt [1]. Zur klinischen Diagnosestellung der Herzinsuffizienz haben sich dabei die sogenannten Framingham-Kriterien etabliert (Tabelle 1.1.1) [2].

Tabelle 1.1.1 Framingham-Kriterien nach [2]: Für die klinische Diagnose einer Herzinsuffizienz müssen zwei Kriterien erster Ordnung oder ein Kriterium erster Ordnung und zwei Kriterien zweiter Ordnung vorhanden sein [1, 3].

Kriterien erster Ordnung	Kriterien zweiter Ordnung
<ul style="list-style-type: none">• Paroxysmale nächtliche Dyspnoe• Halsvenenstauung• Pulmonale Rasselgeräusche• Kardiomegalie• Akutes Lungenödem• 3. Herzton• Erhöhter ZVD• Hepatojugulärer Reflux• Gewichtsabnahme über 4,5 kg in 5 Tagen unter Herzinsuffizienztherapie	<ul style="list-style-type: none">• Unterschenkelödeme• Nächtlicher Husten• Belastungsdyspnoe• Hepatomegalie• Pleuraerguss• Tachykardie• Vitalkapazität vermindert auf unter $\frac{1}{3}$ des Maximums

Die Einteilung des Schweregrads der Herzinsuffizienz erfolgt durch eine - auch im klinischen Alltag verwendete - funktionelle Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) (siehe auch Tab. 1.1.2) [4].

Tabelle 1.1.2 Funktionelle Klassifikation der Herzinsuffizienz basierend auf dem Schweregrad der Symptome und physischer Aktivität nach der New York Heart Association [4, 5].

Stadium	Kriterien
I	Patienten mit Herzerkrankung ohne Limitationen der körperlichen Leistungsfähigkeit. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine übermäßige Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
II	Patienten mit Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
III	Herzerkrankung mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und eventuell sogar in Ruhe.

Sowohl in den Guidelines als auch in nahezu allen klinischen Studien wird der Begriff „Herzinsuffizienz“ anhand des klinischen Syndroms definiert.

1.1.2 Diagnosestellung

Entsprechend den deutschen „Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz“ [6] muss die kardiale Dysfunktion zur Diagnosestellung neben dem klinischen Syndrom zusätzlich noch objektiviert werden. Zur Objektivierbarkeit der (systolischen) Herzinsuffizienz wird zumeist die Bestimmung der sogenannten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) verwendet. In die Berechnung der LVEF (s. Abb. 1.1.1) gehen dabei das enddiastolische und das endsystolische Volumen ein, wobei die Differenz aus diesen beiden (Zähler des Bruches) das Schlagvolumen darstellt.

$$\text{LVEF} = \frac{(\text{enddiastolisches Volumen} - \text{endsystolisches Volumen})}{\text{enddiastolisches Volumen}} \times 100$$

Abbildung 1.1.1 Formel zur Berechnung der linksventrikulären Ejektionsfraktion.

Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind im Regelfall kardiale Erkrankungen, welche ein systolisches Herzversagen verursachen und somit mit einer reduzierten LVEF ($\leq 40\%$) einhergehen. Diese werden daher auch als „HF-REF“ („heart failure with a reduced ejection fraction“) bezeichnet. Liegt eine Einschränkung der diastolischen Funktion bei erhaltener LVEF vor, wird von einer „HF-PEF“ („heart failure with preserved ejection fraction“) gesprochen [7]. Beide Formen liegen nur selten isoliert vor und können ineinander übergehen. Als Goldstandard zur Bestimmung der LVEF (Diagnose der HF-REF) sowie zur Detektierung von Relaxationsstörungen (Diagnose der HF-PEF) dient zumeist die Echokardiographie [8–10].

1.1.3 Ätiologie, Epidemiologie und zeitlicher Verlauf

Ätiologisch wird eine Vielzahl von verschiedenen Ursachen der Herzinsuffizienz unterschieden, wobei die Gründe im Wesentlichen myokardial, valvulär, perikardial, endokardial, kongenital, durch Arrhythmien, Erkrankungen des Reizleitungssystems, Situationen erhöhten Bedarfs oder Volumenüberlastung bedingt sein können (s. Anhang 10.1). Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist dabei mit bis zu zwei Drittel die am weit häufigsten zu Grunde liegende Ursache [11].

In der westlichen Welt wird altersabhängig von einer Prävalenz¹ der Herzinsuffizienz zwischen einem und zwei Prozent ausgegangen. Unter 50 Jahren liegt die Prävalenz deutlich unter einem Prozent, ab 75 Jahren steigt diese jedoch auf 8,4 % und über 80 Jahre auf 9,1 % [12, 13]. Die Inzidenz² liegt zwischen 5-10 pro 1000 Personen – wiederum mit zunehmender Häufigkeit im Alter [14, 15]. In Deutschland ist die Herzinsuffizienz mittlerweile die dritthäufigste Diagnose bei vollstationär behandelten Patienten sowie die dritthäufigste Todesursache [16].

Grundsätzlich ist die Herzinsuffizienz ein chronischer Zustand [14], wobei der zeitliche Verlauf zwischen einer akuten und einer chronischen Herzinsuffizienz nur unscharf definiert ist. So wird von einer chronischen Herzinsuffizienz gesprochen, wenn Patienten schon „eine Zeit lang“ [1] Symptome zeigen. Bei der akuten Herzinsuffizienz treten hingegen schwere Symptome und klinische Befunde meist innerhalb von 24 Stunden nach einem entsprechenden klinischen Korrelat auf [14]. Zeigt die Herzinsuffizienz über einen Monat keine Progredienz spricht man von einer „kompensierten Herzinsuffizienz“. Verschlechtert sich eine bekannte Herzinsuffizienz, wird diese als „dekompensiert“ bezeichnet, bzw. als „akut dekompensiert“, wenn dies plötzlich geschieht.

¹ Anzahl der zum Untersuchungszeitpunkt Kranken

² Anzahl der Neuerkrankungen pro betrachteter Zeitspanne (hier pro Jahr)

1.1.4 Kompensationsmechanismen

Als Folge einer sich entwickelnden (chronischen) Herzinsuffizienz greifen zunächst hilfreiche Kompensationsmechanismen, die jedoch im Verlauf zu einer Verschlechterung der hämodynamischen Situation und somit zu einem Eintritt in einen Circulus vitiosus hin zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz führen [17]. Hierzu gehören

- a) die Aktivierung neuroendokriner Systeme mit in Folge verändertem myokardialen Kontraktionsverhalten (Sympathikusaktivierung mit Katecholaminausschüttung, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, Vasopressin/ADH-Aktivierung, Freisetzung natriuretischer Peptide) sowie
- b) das Remodelling mit
 - a. maladaptiver, zunehmender Myozytengröße ohne Zunahme der Myozytenanzahl (Hypertrophie)
 - und
 - b. vermehrtem Einbau von Bindegewebe (Fibrose).

Alle drei Kompensationsmechanismen werden durch das Endothelin-System auf unterschiedliche Art und Weise beeinflusst (s.u.). Daher war es Teil dieser Arbeit die Beeinflussung des myokardialen Kontraktionsverhaltens und der Myokardhypertrophie durch Endothelin sowie deren Modifikation durch einen spezifischen Endothelin-Antagonisten unter physiologischen wie pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen.

1.2 Das Endothelin-System

1.2.1 Allgemeines

Die Erstentdeckung des Hormons Endothelin (ET) aus dem Überstand von kultivierten Aortenendothelien des Rindes gelang 1985 Kristine Hickey et al. [18]. Sie konnte zeigen, dass ET an Koronararterien von Schweinen, Rindern und Kaninchen einen konzentrationsabhängigen, konstriktorischen Effekt erzeugte. Erstmals isoliert, sequenziert und benannt wurde ET von Yanagisawa et. al 1988 [19], gefolgt von der Differenzierung der drei Isopeptide ET-1, 2 und 3 [20]. Die Endotheline sind eine

Gruppe von zyklischen Peptiden, die 21 Aminosäuren umfassen und sich durch zwei Disulfidbrücken kennzeichnen. ET-1 wird dabei auf Chromosom 6, ET-2 auf Chromosom 1 und ET-3 auf Chromosom 20 kodiert [20]. Interessanterweise besitzen die Endotheline eine große Sequenzhomologie zu der Venomgruppe (= Schlangengifte) der Sarafotoxine (Abb. 1.2.1).

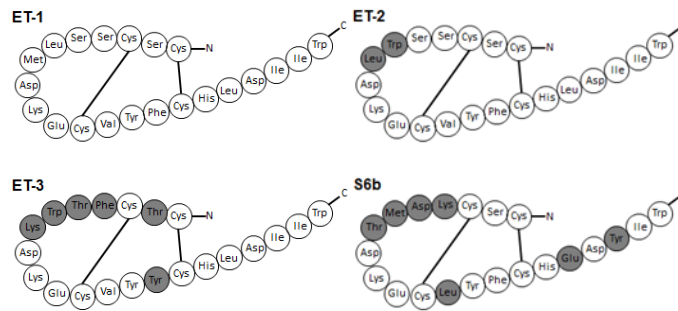


Abbildung 1.2.1

Aminosäuresequenzen der drei ET-Isoformen sowie des Venoms Sarafotoxin S6b. Grau hinterlegt sind die Aminosäuren, die vom ET-1 abweichen. Zusammengefasst und modifiziert aus [21] und [22].

Der berühmteste Effekt des ETs ist der des zur Zeit potentesten bekannten Vasokonstriktors [19]. Außerdem umfasst es unter anderem positive ino- [23] und chronotrope Eigenschaften [24], ist mitogen, beeinflusst die Salz- und Wasser-Homöostase sowie die Aktivität des RAAS-Systems [25] (siehe auch Tabelle 1.2.1). Die ET-Freisetzung kann durch verschiedene Stimuli, wie insbesondere Scherstress, aber auch andere vasoaktive Hormone, Wachstumsfaktoren, Hypoxie, Lipoproteine, freie Sauerstoffradikale oder Cyclosporin positiv beeinflusst werden [19, 26, 27].

Tabelle 1.2.1: Auswahl von vasoaktiven Faktoren. Modifiziert aus [28].

Vasodilatatorische, natriuretische und anti-mitogene Faktoren	Vasokonstriktive, anti-natriuretische und mitogene Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> Natriuretische Peptide Kallikrein, Kinine Prostaglandine Niedrigdosis Dopamin Stickstoffmonoxid (NO) 	<ul style="list-style-type: none"> Renin-Angiotensin-Aldosteron-System Sympathikus Vasopressin Thromboxane Endothelin

1.2.2 Biosynthese

Das initiale Transkriptionsprodukt des humanen ET-1-Gens ist das 212 Aminosäuren umfassende Prepro-ET-1. Nach der Abspaltung einer kleinen Sequenz entsteht Pro-ET und mit dem sogenannten Big-ET-1 ein 38 Aminosäuren langer Vorläufer [19], der auch in der peripheren Zirkulation gefunden werden kann. Dieses wird durch die Endothelin-Converting-Enzyme ECE-1 und ECE-2, Mitglieder der Familie der Zink-Metalloproteinasen, schließlich zu ET umgesetzt [29]. ET-1 besitzt in etwa die 140fache konstriktorische Potenz des Big-ETs [25].

ECE-1 ist ein Membranprotein [30, 31], welches vier Isoformen umfasst, wohingegen sich ECE-2 intrazellulär befindet und hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird [32]. Die Vorherrschende Isoform im menschlichen Gewebe stellt ECE-1a dar [33], welches sich vor allem auf der Zelloberfläche von Endothelzellen befindet. ECE-1-mRNA wird aber auch von humanen Kardiomyozyten exprimiert – insbesondere unter pathologischen Zuständen [34].

ET wird in einer Vielzahl von Geweben gebildet, wobei die jeweilige Isoform meistens gewebespezifisch ist. So wird ET-1 vor allem in Endothelzellen [20], aber auch in Myozyten [35, 36] und Fibroblasten des Herzens [37] exprimiert. Vor allem in Niere und Darm und nur wenig im Myokard wird hingegen ET-2 gebildet [38]. Der Hauptproduktionsort des ET-3 ist hauptsächlich im Gehirn und Epithelzellen der Lunge angesiedelt [39, 40].

1.2.3 Rezeptoren und deren Antagonisten

Insgesamt wurden bisher mit ET_A [41], ET_B [42] und dem ET-3 spezifischen ET_C-Rezeptor [43] drei Rezeptoren des ETs charakterisiert. Sie alle zeigen die klassische Struktur der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben α -helikalen-Transmembrandomänen sowie drei extrazellulären (NH₂) und drei zytoplasmatischen (COOH) Domänen. Die intrazelluläre Domäne interagiert mit heterotrimeren G-Proteinen, die aus einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt sind.

Die mRNA für ET_A-Rezeptoren wird vor allem in glatten Muskelzellen und kardialen Myozyten sowie Fibroblasten exprimiert, nicht aber in Endothelzellen [44]. Die mRNA für ET_B-Rezeptoren ist hauptsächlich in Endothelzellen erhöht [44]. Hier vermittelt der Rezeptor über NO und Prostacyclin eine Vasodilatation [45, 46]. In glatten Gefäßmuskelzellen hingegen folgt seiner Aktivierung eine Kontraktion [47, 48]. Im kardialen Atrium befinden sich quantitativ mehr Rezeptoren als im Ventrikel, von denen 91 % auf Proteinlevel der Klasse der ET_A-Rezeptoren angehören [49]. In ventrikulären Kardiomyozyten ist beim Menschen nur ET_A-mRNA nachweisbar [50], bei Rattenzellen

in bis zu 80 % [51]. In nicht-myozytären Herzzellen wie Fibroblasten und Endothelzellen konnten beide Rezeptorenklassen nachgewiesen werden [50].

Eine alternative Einteilung der Rezeptorklassen findet nach ihrer Pharmakodynamik statt [52]: So bindet ET_A an das NH₂-Ende der Endotheline [44] – die Rezeptoraffinität von ET-1 ist dabei zehnfach stärker als von ET-2, welches wiederum stärker gebunden wird als ET-3. Der ET_B-Rezeptor hingegen bindet das COOH-Ende der Endotheline und hat aufgrund der dort vorliegenden großen Strukturähnlichkeiten der unterschiedlichen Endotheline eine fast gleich starke Affinität zu diesen [25, 42].

Diskutiert wird auch ein Zusammenspiel der beiden Signaltransduktionswege von ET_A und ET_B über eine funktionelle Heterodimerbildung [53, 54].

Schon früh nach der „Entdeckung“ des ETs kam die Idee auf, regulatorisch in dieses System einzugreifen: So konnte zum Beispiel schon Anfang der 90er Jahre gezeigt werden, dass bei Patienten, die aufgrund eines Hämangioendothelioms mit erhöhten ET-Konzentrationen an einer schweren Hypertonie litten, diese durch Resektion des Tumors normalisiert werden konnte [55]. Aufgrund des hauptsächlich autokrin-parakrinen Effekts des ETs (s. Abschnitt 1.2.4) zeigte sich bei essentieller Hypertonie jedoch keine Korrelation zwischen der ET-Plasmakonzentration und dem Blutdruck [56]. Der vielversprechende Effekt als Medikamentengruppe zur Blutdrucksenkung im großen Kreislauf [57, 58] konnte klinisch v.a. aufgrund der Nebenwirkungen der Lebertoxizität und Flüssigkeitsretention leider nicht umgesetzt werden [59]. So konnten der ET_A/ET_B-Rezeptorantagonist Bosentan und der selektive ET_A-Antagonist Darusentan zwar den Blutdruck senken, erhielten aber aufgrund des Wirkungs- und Nebenwirkungsprofils keine Zulassung [60, 61]. Neuere Studien beschreiben den ET_A-Rezeptorantagonisten Avosentan als mögliches Therapeutikum eines Endorganversagens durch Hypertension [62, 63].

Bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) handelt es sich um eine „chronische Erhöhung des pulmonal-arteriellen Mitteldruckes > 20 mmHg in Ruhe“ [17]. Im Gegensatz zur systemischen Hypertonie können bei Patienten mit PAH erhöhte ET-Konzentrationen im Plasma und Lungengewebe nachgewiesen werden [64, 65], was zur Entwicklung einer Vielzahl von Endothelin-Rezeptorantagonisten (ERA) führte. So ist der oben schon erwähnte duale (=ET_A/ET_B) ERA Bosentan aktuell Therapie der ersten Wahl bei einer PAH für die Stufen II und III der WHO-Klassifikation [66]. Das gleiche gilt für den selektiven ET_A-Rezeptorantagonist Ambrisentan [66]. Mit Sitaxsentan wurde ein zuerst vielversprechender selektiver ET_A-Rezeptorantagonist [67] aufgrund von Todesfällen bei Leberversagen [68] wieder vom Markt genommen. Die Neuentwicklung Macitentan als dualer ERA zeigte deutlich geringere

Nebenwirkungen bei vermutlich stärkerer Wirkung als die Vorgänger [69]. Auch als sogenannte „orphan drugs“³ bei der Behandlung von Ulzera der Extremitäten bei Sklerodermie sind ERAs etablierte Therapeutika [70].

In dieser Arbeit wurde der experimentelle, nichtselektive ET_A/ET_{B1}-Rezeptorantagonist PD142893 verwendet (Ac-(3,3-D-diphenylalanyl)-L-Leu-L-Asp-L-Ile-L-Ile-L-Trp Trifluoroacetat) [71, 72]. Schon vor über 20 Jahren wurde der Verdacht auf eine notwendige Subdifferenzierung des ET_B-Rezeptors in ET_{B1} und ET_{B2}-Rezeptoren geäußert [73, 74] sowie später gezeigt, dass die zwei Varianten des ET_B-Rezeptors auf unterschiedlichen Zellen existieren, aber aus dem identischen Gen hervorgehen [75]. Auch wurde ein Unterschied der ET_B-Rezeptoren während Entwicklung und Progression einer Kardiomyozyten-Hypertrophie postuliert [76]. Dabei stellt ET_{B1} den PD142893-sensitiven und ET_{B2} den PD142893-resistenten Rezeptor dar.

1.2.4 Plasmakonzentration

In gesunden Menschen variieren die gemessenen mittleren Plasmakonzentrationen mit einer Spannweite von 0,1 bis 5 pM relativ stark [21, 77, 78]. Diese große Varianz ist wohl hauptsächlich durch die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der sehr niedrigen Konzentrationen und den verschiedenen Plasmabestandteilen, die mit den Messungen interagieren können, begründet [79, 80].

Zirkulierendes ET scheint eine (patho)physiologische Relevanz zu haben, unabhängig davon, dass zirkulierende ET-Konzentrationen niedriger sind als solche, die *in vitro* und *in vivo* eine Rezeptoraktivierung auslösen können [77, 81]. Dies legt auch nahe, dass ET hauptsächlich als eine autokrin-parakrine Substanz wirkt und weniger als ein zirkulierendes Hormon [21]. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass Endothelzellen ET polar und zwar vor allem basal sekretieren, also in Richtung der Tunica media [82]. Daher vermutet man, dass die dortige Konzentration bis zu 100fach höher ist als die im Plasma [77].

1.2.5 Signaltransduktion

Der ET_A-Rezeptor interagiert mit den G-Proteinen G-α_{q/11} [83], Gα_s [84, 85] sowie Gα₁₂ und aktiviert über die Phospholipase-C_β (PLC_β) die Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositol. Aus diesem entstehen so Inositol – 1,4,5 –Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) [86, 87]. IP₃ setzt im Folgenden Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei [88]. DAG hingegen aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die kurzfristig Proteine des kontraktilen

³ Arzneimittel, die für die Behandlung seltener Krankheiten eingesetzt werden

Apparates phosphoryliert und sie dadurch für Ca^{2+} sensibilisiert [89]. Außerdem aktiviert die PKC sogenannte „Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen“ (MAP-Kinasen) [90, 91] und beeinflusst so längerfristige Zellantworten wie Proliferation und Migration [92]. Schließlich bewirkt eine ET_A -Aktivierung auch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels [93]. Der ET_B -Rezeptor hingegen interagiert insbesondere mit $\text{G}\alpha_{i/o}$ und $\text{G}\alpha_{13}$ [84], was im Folgenden zu einer Inhibierung sowohl der Phosphatidyl-Inositol-Hydrolyse als auch der cAMP-Akkumulation führt [94].

Zusätzlich aktiviert ET-1 die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die NADPH-Oxidase mit Beeinflussung des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE) [95]. All diese Signalwege beeinflussen die kardiale Kontraktilität und zum Teil auch Hypertrophie [93]. Beides wurde - inklusive ausgewählter Signalteilwege – in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.2.6 Abbau

Die Entfernung von ET aus der Zirkulation geschieht sehr schnell: In der Ratte liegt die biologische Haltbarkeit bei circa einer Minute [96]. Da der blutdrucksteigende Effekt jedoch eine Stunde anhält, muss die Wirkdauer von anderen Faktoren abhängen [97]. So konnte gezeigt werden, dass die Aufhebung des ET-1/ ET_A -Bindungskomplexes nur langsam stattfindet bzw. es wird sogar vermutet, dass diese Bindung kovalent und damit quasi-irreversibel ist [98]. Daher wurde postuliert, dass die Zeit bis zur Ligand-Rezeptor-Internalisierung und nicht die ET-Dissoziation über die Dauer der ET-1-Antwort bestimmt. Nach Internalisierung bleibt ET mit seinem Rezeptor im Endosom noch bis zu zwei Stunden verbunden [99]. Die Kolokalisation des ET-1/ ET_A -Rezeptors mit caveolar domains hilft vielleicht bei der Interaktion mit G-Proteinen und dabei, dass das ET-1- ET_A -Signal auch nach Entfernung aus der Zirkulation durch Internalisierung des ET-1 bestehen bleibt [100].

Die ET-Plasmaentfernung scheint vor allem durch ET_B -Rezeptorenbindung auf Endothelzellen der Lungengefäße [101–104] mit folgender Internalisierung und Abbau durch neutrale Endopeptidasen zu geschehen [105].

Interessanterweise werden - jeweils mit ET-1 gebundene - internalisierte ET_A -Rezeptoren zu anderen Orten in der Zelle transportiert als ET_B -Rezeptoren: ET_A wird in das sogenannte „pericentrioläre Recycling Kompartiment“ geführt und kann recycelt werden, wohingegen ET_B in das Lysosom geführt und dort degradiert wird [93, 102, 106].

1.2.7 Physiologische Wirkungen des Endothelins im kardiovaskulären System

Die physiologischen ET-abhängigen Effekte im kardiovaskulären System sind umfassend und facettenreich. So braucht man ET-1 schon während der embryonalen Entwicklung zur Bildung des Aortenbogens [107]. ECE-1- und ECE-2- knockout Mäuse zeigen schwere angeborene Herzfehler [108]. Kardiomyozyten brauchen ET zum Überleben und es hemmt das Kardiomyozytensterben während der Altersentwicklung [109]. Im Rattenherzen moduliert es den koronaren Blutfluss durch Regulierung des Gefäßtonus [110, 111].

Im Herzen führt ein durch Myozytendehnung und auch in Myozyten generiertes ET kurzfristig zu einer Erhöhung der Kontraktilität bei erhöhtem Workload [112], wobei diese Steigerung der Produktion und Sekretion entweder direkt geschieht oder durch Angiotensin II induziert wird [85, 112–115]. Das Ergebnis ist eine gesteigerte und den erhöhten Bedürfnissen angepasste Kontraktilität. Vermutlich ist dies auch Teil des biologischen Korrelats des sogenannten Anrep-Phänomens - der physiologischen Anpassungen des Schlagvolumens bei erhöhter Nachlast. Bei unterschiedlichen Nagetieren zeigt ET - insbesondere in den Atria - vor allem positiv inotrope [23, 116–118], aber auch negativ inotrope Eigenschaften [119–123]. Hinzu kommen eine positive Chronotropie [24] bis hin zur Induktion von Arrhythmien [124]. Im menschlichen Myokard zeigt ET-1 einen klaren konzentrationsabhängigen, positiv inotropen Effekt, der durch ET_A-Rezeptoren vermittelt wird [125]. Die ET-abhängigen Effekte der kardialen Kontraktilität beruhen offenbar auf Änderungen der systolischen Calciumtransienten [126, 127] und Änderungen der Myofilamentsensitivität auf Calcium [128–130].

Der Nettoeffekt des ETs auf das periphere kardiovaskuläre System ist moduliert durch die Balance zwischen ET_A und ET_B vermittelten Effekten. Die wichtige physiologische Rolle des ETs in der Kontrolle des Gefäßwiderstandes und des Blutdrucks konnten schon Parris und Webb 1997 zeigen [131]: Die Aktivierung von ET_A über glatte Gefäßmuskelzellen bewirkt eine Vasokonstriktion mit Blutdruckerhöhung, während die Aktivierung von ET_B auf Endothelzellen und in der Niere über eine NO-getriggerte Vasodilatation bzw. Natriurese eine Blutdrucksenkung bewirkt. Zusammenfassend scheint der physiologische Nettoeffekt im Menschen allerdings eine Blutdrucksteigerung zu sein, da die Gabe von ET_{A/B}-Rezeptorantagonisten zu einer Blutdrucksenkung führt [21, 132].

Zwei große Kontroversen bleiben die Mechanismen und die spezifischen molekularen Angriffspunkte, die diese Funktionen vermitteln [93].

1.2.8 Pathologische Wirkungen des Endothelins im kardiovaskulären System

Eine gesteigerte ET-Konzentration findet man bei diversen pathologischen Zuständen des Herzens, zum Beispiel nach Ischämie [34], bei kardialer Hypertrophie [133, 134], Vorhofflimmern [134] dilatativer Kardiomyopathie [135] sowie bei unterschiedlichen Formen der (chronischen) Herzinsuffizienz [136–139]. Dabei korreliert bei Patienten mit Herzinsuffizienz der Anstieg der ET-Plasmakonzentration mit unterschiedlichen Herzinsuffizienz-Parametern⁴ [140, 141].

Diese gesteigerten ET-Level entstehen vermutlich aufgrund gesteigerter Transkription, da sowohl mRNA-Level wie auch die Proteinlevel des maturen Peptid erhöht sind [109, 141–143]. Auch ECE-1a (Big-ET-1 => maturen ET-1) und der ET_A-Rezeptor [125, 142, 144] sind in der Herzinsuffizienz hochreguliert [145]. Zusammengefasst werden also unter pathologischen Bedingungen sowohl die Mechanismen zur ET-Produktion als auch -Detektion an und in direkter Nachbarschaft um Kardiomyozyten gesteigert.

1.2.9 Einfluss des Endothelins auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz

Wie schon unter Punkt 1.1.4 erwähnt, existieren mit der Aktivierung neuroendokriner Systeme und dem Remodelling mit Myozytenhypertrophie und Fibrose drei zunächst hilfreiche Kompensationsmechanismen, die jedoch im Verlauf zu einer Verschlechterung der hämodynamischen Situation und somit zu einem Eintritt in einen Circulus vitiosus hin zu einer dekompenzierten Herzinsuffizienz führen [17].

In den unterschiedlichen *neuroendokrinen Systemen* steigert ET-1 zum Beispiel die Konversion von Angiotensin I zu II in kultivierten Endothelzellen [146], die Aldosteronsynthese in der Ratte [147] und die Katecholaminfreisetzung in der Zellkultur von chromaffinen Zellen [148]. Umgekehrt stimulieren Angiotensin II und Vasopressin wiederum die ET-Sekretion aus kultivierten Endothelzellen [149]. Zusammenfassend zeigt dies, dass sich die ET-Freisetzung und verschiedene neuroendokrine Systeme gegenseitig beeinflussen und sich so ihre vasokonstriktorisches und Natriumretentions-Wirkungen gegenseitig potenzieren.

Auch auf das *kardiale Remodelling* mit maladaptiver Myozytenhypertrophie und Fibroblastenproliferation mit folgend erhöhter Kollagenproduktion spielt ET eine große Rolle [17, 150]. Schon früh konnte ein prohypertropher Effekt des ETs in neonatalen kardialen Rattenmyozyten [151, 152] gezeigt werden. Dieser Effekt geht wohl vor allem auf in Myozyten lokal produziertes ET zurück [153] und stellt einen autokrin-parakrinen,

⁴ positiv mit LVEDV und PAH, negativ mit LVEF und CI

hauptsächlich ET_A-vermittelten Faktor der Hypertrophie dar [154, 155]. ET verändert dabei die Expression hunderter Gene [156] und bewirkt eine vermehrte Produktion von kontraktile Filamenten wie MLC2, Aktin und Troponin I [151]. Dies wird vermittelt durch eine ET_A- und G- α_q -abhängige PLC β -Aktivierung [157] mit folgender Phosphorylierung einer Untergruppe der „mitogen aktivierten Proteinkinasen“ (MAPKs), den sogenannten „Stresskinasen“ (SAPKs) [158]. Außerdem ist ET ein Wachstumsfaktor in glatten Gefäßmuskelzellen [159].

1.3 Fragestellung

Die erste Fragestellung dieser Arbeit ist, ob PD142893-sensitive (ET_{B1}) und PD142893-resistente (ET_{B2}) Rezeptoren unterschiedlich in die Entwicklung und das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz mit ihren Teilaspekten des myokardialen Kontraktionsverhaltens sowie der kardialen Hypertrophie einwirken.

Kardiale Stressbedingungen, wie sie im Kontext von Diabetes bzw. Hyperglykämie [160–162] und chronischer Hypertension [141] vorliegen, sind in der Lage die Ansprechbarkeit von ET-Rezeptoren zu verändern. In einer zweiten Fragestellung soll daher untersucht werden, ob eine Veränderung der ET-Antworten unter diesen beiden pathophysiologischen Bedingungen gezeigt werden kann.

2 Material

2.1 Chemikalien

Benzonase [®]	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen [®]	Linde, Pullach
Collagenase Typ CLSII (322 U/mg)	Biochrom, Berlin
DTT	Sigma, Taufkirchen
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Merck, Darmstadt
Tris/HCL	Merck, Darmstadt
Tween [®] 20	Sigma, Taufkirchen

2.2 Antikörper für Immunoblots

Primäre Antikörper

anti-p38-MAP-Kinase (gesamt)	Sigma, Taufkirchen
anti-p38-MAP-Kinase (phosphoryliert)	Sigma, Taufkirchen
anti-p42/44-MAP-Kinase (phosphoryliert)	Cell Signaling Technologies, Danvers
anti-c-Jun-Kinase (phosphoryliert)	Cell Signaling Technologies, Danvers

Sekundäre Antikörper

anti-rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen
anti-mouse IgG	Sigma, Taufkirchen

Alle übrigen Chemikalien werden in der jeweils höchsten Qualität bezogen und entsprechend den Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.3 Geräte und Laborbedarf

2.3.1 Allgemein verwendete Geräte

Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizblock	Labtech International, Burkhardtsdorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Kolbenhub-Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler, Typ: WT 12	Biometra, Göttingen
Sterilbank, Typ: Lamin Air® HSP 18	Heraeus, Hanau
Vakuum-Pumpe Vacusafe	IBS INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabol Labortechnik GmbH, Seelbach

2.3.2 Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände

Zellkultur

Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Institutes der JLU Gießen

Material

Tissue Chopper	Mickle Laboratory Engineering, Gomshall
Nylonnetz (Polyamid, 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Brutschrank, Typ: BBD 6220	Heraeus, Hanau
Mikroskop CKX14	Olympus, Hamburg
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge, Typ: Allegra™ 6 Centrifuge	BeckmanCoulter™, Fullerton
Kulturschalen, Typ: Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg

System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellverkürzung

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop TMS-F	Nikon, Japan
Monitor	Philips One Dimensional Camera ZK4, Köln
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Stimulator	Eigenbau des Physiologischen Institutes der JLU Gießen

Slot Blot

Minifold® I SlotBlot-System	Whatman®, Maidstone
PVDF-Blotmembran	Millipore, Eschborn
Filterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Rapid Step™ ECL Reagent	Calbiochem, Darmstadt

ECL-Gerät

ChemiDoc™ XRS	BioRad, München
---------------	-----------------

Zellhypertrophiemessung

Mikroskop BZ-800K	Keyence, Neu-Isenburg
-------------------	-----------------------

Verbrauchsmaterialien

50 ml Röhrchen, Typ: Falcon 2070	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen Typ Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm „M“®	Pechiney Plastic Packaging, Menasha
Pipetten Falcon 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipetten Falcon 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Material

Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilium® classic pure	Bode Chemie, Hamburg
Einweg-Zellschaber Typ: Falcon 3087	Becton Dickinson, Heidelberg

2.4 Software

BZ-Observation Application	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
BZ-Analyzer	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
ChemiCapt 5000	Vilber Lourmat, Frankreich
Microsoft Word 2007®	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Excel 2007®	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MUCELL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Quantity One®	Molecular Dynamics, Krefeld
SPSS Statistics 16.0	SPSS GmbH Software, München

2.5 Puffer und Lösungen

Powell-Medium zur Isolierung von Herzmuskelzellen der Ratte

NaCl	110 mM
KCL	2,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	25 mM
Glucose	10 mM

Collagenase Stammlösung

Collagenase	25 mg (kann chargenabhängig differieren)
CaCl ₂ (100 mM)	12,5 µl
Powell-Medium	5 ml

M199 / HEPES gepuffert

Medium 199/Earl's Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mM
auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert	

Material

CCT-Kulturmedium

M199 / HEPES gepuffert	x ml
Creatin	5 mM
Carnitin	2 mM
Taurin	5 mM
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10 µM
auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert	

Vorplattiermedium

CCT-Kulturmedium	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Ausplattier- und Waschmedium für isolierte Zellen

CCT-Kulturmedium	x ml
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

PBS

NaCl	137 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	1,0 mM
KCl	2,7 mM

TBS

Tris/HCL	10 mM
NaCl	150 mM
pH 7,4	

Material

Lysispuffer

Tris/HCl	50 mM
SDS	2 % (wt/vol)
DTT	100 mM
Natriumvanadat (1 mM)	10 % (vol/vol)
pH 6,7	

Auftragungspuffer

Glycerin	0,5 ml
10x TEA	1 ml
Bromphenolblau	1/10 Spatelspitze

Antikörperlösung

Tris/HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Tween®20	0,05 % (vol/vol)
BSA	2 % (wt/vol)
pH 7,4	

AP-Puffer

Tris/HCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM
pH 9,5	

3 Methoden

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

Die für die Messung der Myokardzellkontraktion und im Folgenden für die Proteinbestimmung im SlotBlot verwendeten Herzmuskelzellen werden aus männlichen Wistar- bzw. SH-Ratten isoliert. Dies geschieht im Alter von drei bis vier Monaten und einem Gewicht von 200 – 300 g. Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgt im hauseigenen Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Diese erhalten dabei freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin®) und Wasser. Die Haltung entspricht der „Guide for Care and Use of Laboratory Animals“ der „US National Institutes of Health“ (NIH publication No. 85 – 23, geändert 1996). Die Tiertötungsvorgangsnummer nach §4 Abs.3 des Tierschutzgesetzes wird unter der JLU-Nummer mit folgender interner Kurzbezeichnung geführt: „472_M AG Prof. Schlüter, Kardiomyozyten Langendorff“

3.1.2 Präparation und Isolierung ventrikulärer Kardiomyozyten adulter Ratten

Als Grundlage der Versuche dienen frisch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten der oben näher beschriebenen Ratten. Die durchgeführte Zellisolation entspricht der schon vorher beschriebenen [163, 164] und später weiterentwickelten Methode [165], welche hier im Folgenden verkürzt beschrieben werden soll:

Vorbereitung

Die Langendorff-Apparatur besteht aus zwei Kreisläufen, einem inneren und einem äußeren. Der Äußere ist für die Aufrechterhaltung einer konstanten und physiologischen Temperatur von 37 °C im Inneren zuständig und wird dafür mit aufgeheiztem, zirkulierendem Wasser gefüllt. Der innere Kreislauf wird zuerst mit aqua bidest, dann mit Powell-Medium gespült und schließlich mit 80 ml des Powell-Mediums blasenfrei aufgefüllt. Um einen physiologischen pH von 7,4 zu erhalten, wird das Medium konstant mit einem Sauerstoff-Carbogen-Gemisch begast.

Präparation

Nach circa einminütiger Kurznarkose mit Isofluran erfolgt die Tötung der Ratten durch Genickbruch, gefolgt von einer Thorakotomie und der Darstellung des

Herz-Lungen-Paketes. Dieses wird entfernt, sofort in eiskalte physiologische Kochsalzlösung überführt und somit vom extravasalen Blut freigewaschen. Durch Abtrennung von Mediastinum, Lunge, Luft- und Speiseröhre erhält man schließlich das separierte Herz mit anhängender Aorta. Diese wird hinter dem Abgang des Truncus anonymus durchtrennt, die Aorta ascendens an die Langendorff-Perfusionskanüle angeschlossen und schließlich mit OP-Zwirn befestigt.

Reperfusion des Herzens und Isolierung der Kardiomyozyten

Um auch das intravasale Blut auszuwaschen, erfolgt nun mit 40 ml Powell-Medium eine nicht-rezirkulierende, retrograde Perfusion des Herzens von mindestens zwei Minuten. Nach Zugabe von 5 ml Collagenase-Stammlösung (Powell-Medium + Collagenase-Stammlösung = Perfusionslösung) zur Spaltung der Zell-Zell-Verbindungen wird das System geschlossen. Hierdurch perfundiert die Lösung das Herz für 25 min retrograd bei einer Flussrate von 1,5 ml/min rezirkulierend.

Nach dieser Reperfusion erfolgt ein Abtrennen der Vorhöfe und der Aorta vom Herzen, die übriggebliebenen Ventrikel werden zweimal aufgeschnitten und durch den tissue chopper auf eine Schnittbreite von 0,7 mm zerkleinert. Die hergestellte Zellsuspension wird in 12 ml der Perfusionslösung überführt und mit Hilfe eines vorsichtigen Auf- und Abpipettierens einem fünfminütigen Nachverbau mit weiterer Auflösung der Zellverbindungen zugeführt.

Zur Trennung der intakten, kalziumtoleranten und stäbchenförmigen Kardiomyozyten vom restlichen Gewebe folgt der nun näher beschriebene Separationsablauf: Die Suspension wird zuerst durch eine Nylongaze mit 200 µm Porengröße filtriert und dann einer dreiminütigen Zentrifugation bei 400 rpm/min zugeführt. So entsteht durch Sedimentation ein Pellet aus Kardiomyozyten sowie eine darüber liegende Phase aus Perfusionslösung mit darin enthaltenden Zelltrümmern. Nach Absaugen dieses Überstandes wird das verbleibende Zellpellet in Powell-Medium mit einer zusätzlich enthaltenden CaCl_2 -Konzentration von 200 µM gegeben und für zwei Minuten erneut bei 400 rpm/min zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wird in 6 ml Powell-Medium – diesmal mit einer zusätzlich enthaltenden CaCl_2 -Konzentration von 400 µM – aufgenommen. Dieses wird zu einer Suspension aufgeschüttelt, auf zwei mit zwei Drittel mit Powell-Medium und einer CaCl_2 -Konzentration von 1 mM gefüllte Reagenzgläser verteilt und diese erneut für eine Minute bei 300 rpm/min zentrifugiert. So führt man die Kardiomyozyten langsam einer steigenden, sich physiologischen Werten annähernden Calciumkonzentration zu. Abschließend verwirft man den Überstand erneut und überführt die Zellen in der Sterilbank in CCT-Medium (erstmalig beschrieben 1991 durch Volz et al [166]).

3.1.3 Vorinkubation der Kulturschalen und Ausplattieren der Kardiomyozyten

Das komplette Vorgehen der Vorinkubation und Ausplattierung erfolgt unter der Sterilbank, um ein möglichst keimarmes Arbeiten zu gewährleisten. Zusätzlich enthalten die nun verwendeten Medien mit Penicillin und Streptomycin zwei Antibiotika. Über Nacht erfolgt die Inkubation der Kulturschalen vom Typ 3001 mit einem Milliliter Vorplattiermedium, so dass sich das im Medium enthaltene FCS am Boden festsetzt und so später – auch nach Absaugen des restlichen Mediums – ein Anheftsubstrat für die Kardiomyozyten darstellt.

Unmittelbar vor dem Ausplattieren erfolgt das Absaugen des Vorplattiermediums, welches dann durch das Ausplattiermedium ersetzt wird. Dieses enthält das vorher zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelte Zellpellet mit den isolierten Kardiomyozyten. Diese Zellkulturen inkubieren für mindestens zwei Stunden bei 37 °C, um so ein Anheften der Kardiomyozyten zu gewährleisten. Anschließend werden die Kulturschalen zweimal mit Waschmedium gewaschen, um die restlichen abgerundeten und nicht anheftenden Zellen endgültig abzutrennen. Nach dem Waschvorgang liegt der Anteil an lebend-intakten und stäbchenförmigen Kardiomyozyten bei bis zu 90 %. Das in den Medien enthaltene Cytosin- β -Arabinofuranosid dient der Prävention von Zellwachstum nicht-myozytärer Genese.

Pro Herz können auf diese Weise – je nach Qualität der Präparation – bis zu 24 Schalen mit isolierten Kardiomyozyten hergestellt werden.

3.1.4 Inkubation und Kultur der isolierten Kardiomyozyten

Die zu untersuchenden Substanzen werden dem im letzten Waschschrift auf den Schalen verbleibenden Medium hinzugefügt und die so behandelten Kardiomyozyten entweder im Akutversuch nach 10 – 15 min verwendet oder für 6, 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Die Kultur erfolgt bei 37 °C, circa 95 % Luftfeuchtigkeit und unter CO₂-freien Bedingungen. Erst dann verwendet man sie für die Messung der kontraktilen Ansprechbarkeit und im Anschluss für die weitere Untersuchung im SlotBlot. Alternativ werden sie nach 24 Stunden Inkubation der unter Punkt 3.4 beschriebenen Hypertrophieerfassung durch Bestimmung des Zellquerschnitts zugeführt.

3.2 Messung der kontraktilen Ansprechbarkeit im elektrischen Feld

3.2.1 Elektrische Stimulation und Steuerung der Zellverkürzung

Die Methode der Myokardzellkontraktion (genauer „lastfreie Zellverkürzung“) im elektrischen Feld wurde schon 2007 von Langer et al. beschrieben [167] und soll hier verkürzt dargestellt werden:

Die Schalen mit den inkubierten Zellen (siehe 3.1.4) werden aus dem Zellkulturschrank entnommen, diese auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert und mit einem Deckel verschlossen, welcher an seiner Unterseite zwei AgCl-Drähte besitzt. Diese Drähte sind an ein Stimulationsgerät angeschlossen, dienen als Katode bzw. Anode und tauchen hierfür über beinahe den gesamten Schalendurchmesser in das inkubierte Waschmedium. Der Stimulator überträgt somit abwechselnd über die beiden Drähte zwei gleiche, aber entgegengesetzte (= biphasische) Rechteckspannungen in das Waschmedium – und somit auch auf die isolierten Kardiomyozyten. Die Spannung beträgt dabei 60 V und die Dauer des Stromstoßes 50 ms. Die Wiederholungsfrequenz liegt bei zwei Hertz.

Da in dem vorliegenden Modell genau genommen eine Messung der lastfreien Zellverkürzung stattfindet, für eine Aussage über die „Kontraktilität“ aber eine Kraftmessung erfolgen müsste, wird in dieser Arbeit von „kontraktiler Ansprechbarkeit“ oder synonym von der „(lastfreien) Zellverkürzung“ gesprochen.

3.2.2 Messung der Zellverkürzungsparameter

Die Zellverkürzungsparameter werden mit einem speziell hierfür zusammengestellten „System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellverkürzung“ (s. Punkt 2.3.2) erfasst, aufgezeichnet und weiterverarbeitet (Abb. 3.2.1).

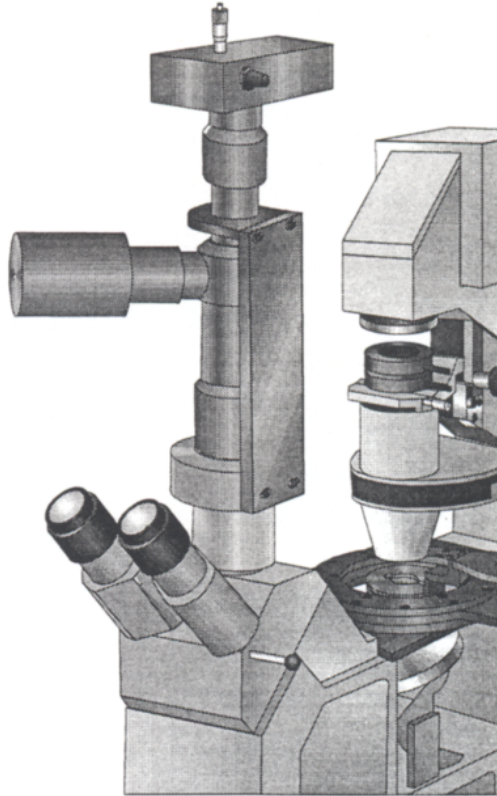


Abbildung 3.2.1
System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellverkürzung. Aus [168].

Auf dem Objekttisch des Systems befindet sich nun also eine durch den Spezialdeckel verschlossene Kulturschale mit den darauf befindlichen Kardiomyozyten, welche bei Stimulation während ihrer Zellverkürzung durch das Mikroskop beobachtet werden können.

Im ersten Schritt wird eine Zelle herausgesucht, die morphologisch den groben Kriterien eines intakten Kardiomyozyten entspricht: Stäbchenform sowie gleichmäßige und prompte Zellverkürzung auf jede Stimulation. Ist eine solche Zelle gefunden, wird auf eine größere Vergrößerung umgestellt und das Okularbild nun auch zeitgleich mit einer Videokamera auf einem Monitor dargestellt. Auf diesem stellt man die Zelle mittig und parallel zum dort eingezeichneten Verlauf einer einzeiligen Zeilenkamera ein (Abb. 3.2.2).

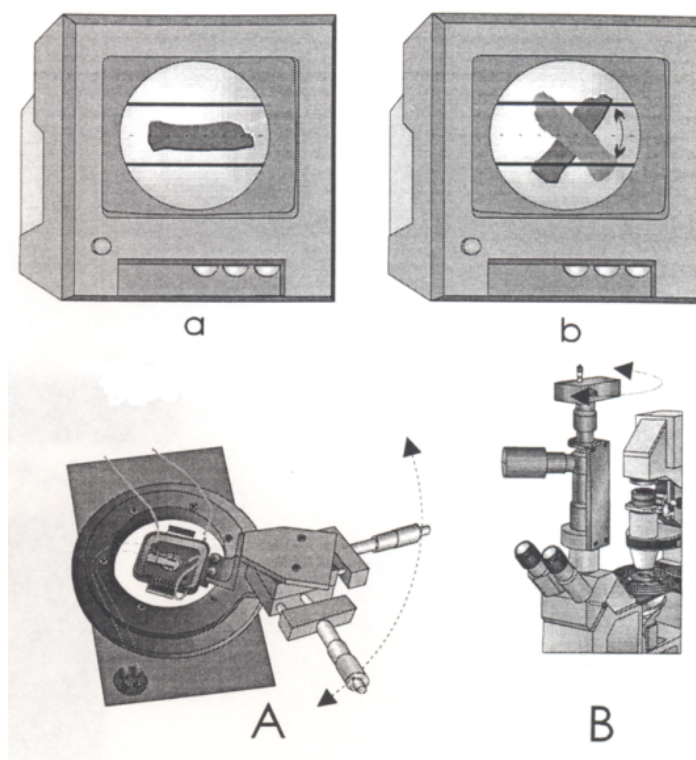


Abbildung 3.2.2
Ausrichtung der Zeilenkamera. Aus [168].

Eine 500 Hz-Zeilenkamera ist über die Wahrnehmung verschiedener Helligkeiten dazu in der Lage, die Zelle vom Hintergrund der Schale zu unterscheiden und somit – nach manuellen Einstellungen durch den Anwender (s.u.) - die Zellgrenzen zu erkennen. Das Kamerabild wird in elektrische Signale transformiert und auf dem Interface eines Oszillographen dargestellt (Abb. 3.2.3).

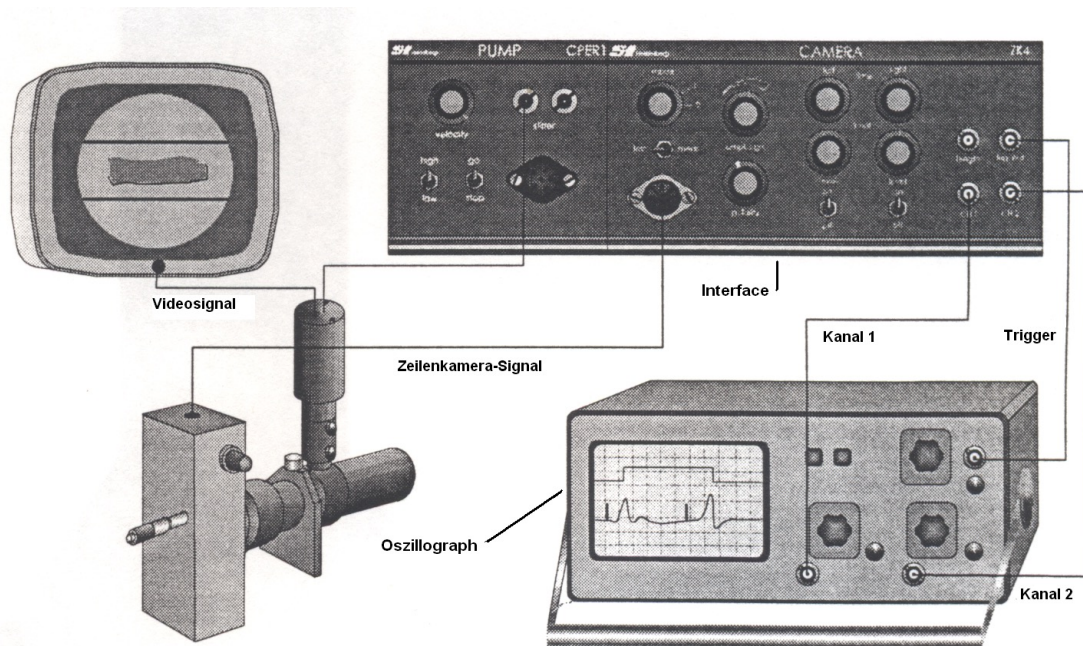


Abbildung 3.2.3

Aufbau der Versuchsvorrichtung aus Zeilenkamera, Bedienfeld und Oszillator. Aus [168].

Der Oszillograph ist fix auf eine Ablenkzeit von $0,1 \text{ ms/cm}$ und eine Vertikalverstärkung von $0,5 \text{ V/div}$ eingestellt. Unterschiedliche Helligkeiten ergeben somit unterschiedlich starke Auslenkungen auf der y-Achse des Interfaces. Die Zellgrenzen demaskieren sich auf diesem durch große Amplitudensprünge (von dunkel zu hell, bzw. hell zu dunkel) im Ruhezustand sowie durch starke horizontale Bewegungen während der Zellverkürzung des Kardiomyozyten.

Das eigentliche Ausmessen der einzelnen Zellverkürzungsparameter geschieht über das Ablesen einer an einem zweiten Kanal anliegenden Spannung und deren Auswertung mithilfe des Programms MUCCELL: Hierzu wird die zweite Spannung manuell so vom Anwender getriggert, dass eine Triggermarke auf dem Interfacebildschirm vor die erste (= linke) Zellgrenze gesetzt wird. An der Stelle, wo eine rechts der Triggermarke liegende Amplitude (in diesem Fall die erste = linke Zellgrenze) diese Marke übersteigt, beginnt die Aufzeichnung – MUCCELL „erkennt“ die erste Zellgrenze. Erreicht die Spannung die zweite Amplitude (= zweite = rechte Zellgrenze), endet die Aufzeichnung – MUCCELL „erkennt“ die rechte Zellgrenze und somit auch die Zellgesamtlänge vorerst nur in der Diastole (Abb. 3.2.4).

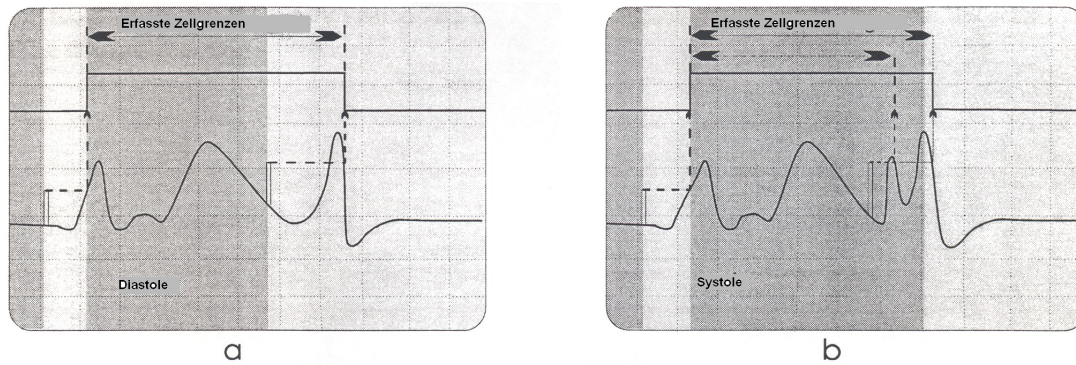


Abbildung 3.2.4

Beispielhafte Abbildung des Oszillatorinterfaces mit Einstellung der Zellgrenzen. Aus [168].

Wird nun über den Stimulator (\Rightarrow AgCl-Drähte \Rightarrow Waschmedium \Rightarrow Kardiomyozyten) eine Zellverkürzung ausgelöst, erfasst MUCCELL auch diese Zellverkürzung über die Zeit. Es werden zwei standardisierte Messprotokolle verwendet: Das erste sieht eine Messung von neun Zellen/Schale bei einer Frequenz von zwei Hertz vor, das zweite eine Messung von drei Zellen/Schale bei den Frequenzen 0,5, ein und zwei Hertz.

3.2.3 Berechnung der Zellverkürzungsparameter

Von jeder Kardiomyozyte werden jeweils vier lastfreie Zellverkürzungen erfasst, in Excel übertragen und hiervon der Mittelwert für die weitere Auswertung mittels SPSS 16.0 berechnet.

Die für die vorliegende Arbeit relevanten erfassten Basis-Parameter zur weiteren Berechnung sind die folgenden:

1. „LDiast“: Diastolische (=maximale) Zelllänge in Mikrometer
2. „Amplitude“: Wert der maximalen Zellverkürzung in Mikrometer

Hieraus errechnet sich der Wert „dL/L (%)“ (Amplitude der maximalen Zellverkürzung (2) geteilt durch die maximale Zelllänge (1) in Prozent), welcher eine valide Aussage zum kontraktilem Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten gibt und daher vorrangig zur Bewertung herangezogen wird.

3.3 Nachweis der Proteinkinasen p38, JNK und p42/44 im SlotBlot

3.3.1 Probenvorbereitung

Nach Messung der kontraktiven Ansprechbarkeit werden die Zellen zum Nachweis und Quantifizierung der Proteinkinasen p38, JNK und p42/44 geerntet. Dies geschieht nach folgendem Protokoll: Das Waschmedium wird von den Schalen abgesaugt und durch 1 ml 1xPBS ersetzt, um so eine eventuell noch stattfindende Reaktion auf das Agens zu stoppen. Das PBS wird wieder abgesaugt, nun durch 200 µl Lysispuffer pro Schale ersetzt und nach zehnminütiger Inkubation auf dem Schüttler mit 10 µl Benzonase® (100.000 U/vial; Verdünnung 1:30) ergänzt. Diese Endonuklease greift alle Formen von DNA und RNA an und baut sie ab. Das im Lysispuffer enthaltene SDS lädt alle Proteine gleichmäßig negativ auf, was allerdings bei dieser Form der Proteinbestimmung irrelevant ist, da die Proben nicht zur Größenbestimmung entlang eines elektrischen Feldes wandern müssen. Außerdem denaturiert SDS die Proteine durch Unterbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen und Strecken der Moleküle und somit durch Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen. Um diesen Vorgang zu unterstützen, werden die aufgelösten Zellen mit einem sterilen Einmalschaber abgekratzt, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und fünf Minuten bei 95 °C in einem Heizblock erhitzt. Auch das im Lysispuffer enthaltene DTT unterstützt die Denaturierung durch Reduktion und somit Aufspaltung der Disulfidbrücken. Das Natriumvanadat schließlich verhindert den Proteinabbau durch Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

Zur Beschwerung und Färbung der Proben werden in einem letzten Schritt 20 µl des Auftragspuffers in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die Proben bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

3.3.2 Immunologischer Proteinnachweis

Im folgenden Abschnitt werden der immunologische Nachweis und die Quantifizierung der gesuchten Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Antikörper-Reaktion und anschließender Sichtbarmachung mithilfe der Chemilumineszenz beschrieben.

Auftragen der Proben auf eine PVDF-Membran

Nach Auftauen der vorbereiteten Proben (s. Abschnitt 3.3.1) durchmischt man diese mit einem Vortexer. Pro Probe werden daraufhin jeweils 25 µl in einen Slot des Minifold® I SlotBlot-Systems pipettiert. Zwischen Deckel und Boden des Systems wird vorher eine obenliegende, in Methanol getränkte PVDF-Membran (Porengröße 0,45

µm) sowie ein darunterliegender in Blotpuffer B getränkter Filter gelegt und fest aneinander gepresst. Durch einen angeschlossenen Unterdruck werden die Proben nun aus den Slots in die PVDF-Membran gezogen. Nach fünf Minuten wird zur Spülung des noch unter Unterdruck arbeitenden Systems 500 µl Blotpuffer in jeden Slot gegeben.

Um sicherzustellen, dass die spezifischen Antikörper, die im nächsten Schritt aufgetragen werden, nur an „ihr“ spezifisches Proteinen anheften, werden die verbleibenden freien Bindungsstellen der PVDF-Membran durch 5 %iges BSA eine Stunde lang abgesättigt.

Auftragen der Antikörper

Die behandelte PVDF-Membran wird zuerst für fünf Minuten mit 1xTBS gewaschen und dann mit dem ersten Antikörper, welcher spezifisch an die gesuchte Proteinkinase (p38, JNK der p42/44) bindet, über Nacht inkubiert, wodurch ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Am nächsten Morgen wird dieser zweimal jeweils mit 1xTBS plus 0,1 % (vol/vol) Tween®20 abgewaschen und die Membran nun für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser ist gegen einen maus- bzw. rattenspezifischen Abschnitt – je nach Spezies, in denen die Antikörper angezüchtet wurden - auf dem Erstantikörper gerichtet. Es ist ein Antigen-Erstantikörper-Zweitantikörper-Komplex entstanden, an dessen Fc-Ende sich mit der Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase; HRP) ein Enzym befindet. Auch im Anschluss an diese Inkubation wird mit 1xTBS plus 0,1 % (vol/vol) Tween®20 gewaschen, um Reste des ungebundenen Antikörpers zu entfernen.

Detektion der Proteine

Die Detektion und Quantifizierung der Proteinkinasen erfolgt mittels Chemilumineszenz. Hierbei erfolgt eine „Emission von Strahlung, die aus einer chemischen Reaktion resultiert“ [169] – diese emittierte Strahlung kann dann z.B. als Licht detektiert werden.

Im vorliegenden Fall inkubiert man die PVDF-Membran inklusive dem gesuchten Protein, sowie an dieses gebundene Erst- und Zweitantikörper für zwei Minuten mit einem Gemisch aus einer Luminol- und einer Hydrogenperoxidlösung (Rapid Step™ ECL Reagent) (Abb. 3.3.1 oben). Das schon erwähnte, am Fc-Ende des Zweitantikörpers gekoppelte Enzym HRP setzt nun unter Anwesenheit des Hydrogenperoxids das Luminol zu Zwischenprodukten um, welche Licht emittieren [170] (Abb. 3.3.1 unten). Dieses Licht wird dann durch das Chemilumineszenzsystem „ChemiDoc™ XRS“ detektiert, nachdem die Membran in einer von der Software

„ChemiCapt5000“ berechneten Zeit belichtet wurde. Durch diese Methode sind eine optimale Belichtungszeit und eine hohe Nachweisempfindlichkeit gewährleistet.

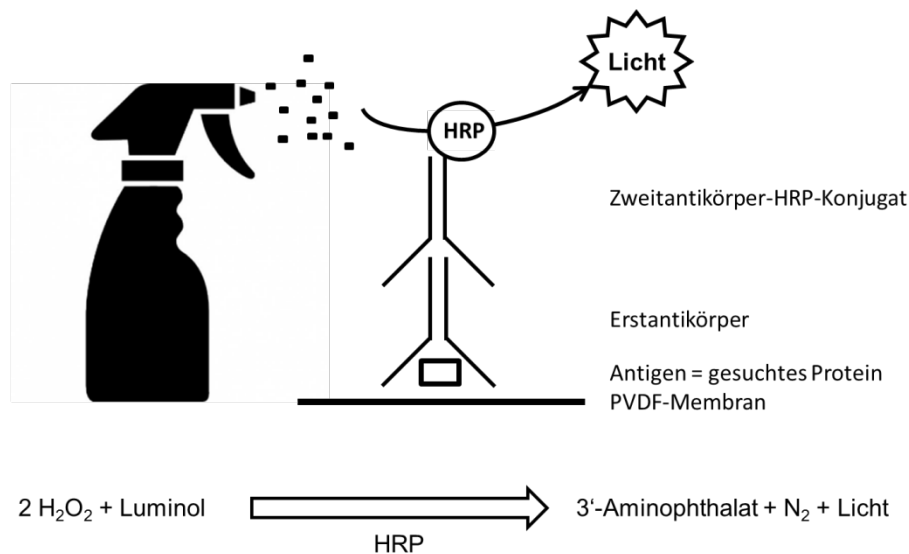


Abbildung 3.3.1: modifiziert aus [170]. Oben: Schema der Funktionsweise des Rapid Step™ ECL Chemilumineszenz-Reagens mit durch Erst- und Zweitantikörper gebundenem Antigen (=gesuchtes Protein). Unten: ablaufende Reaktion aus Reagens und HRP zu Licht.

3.4 Hypertrophieerfassung durch Bestimmung des Zellquerschnitts

Die behandelten Kardiomyozyten (s. Punkt 3.1.4) werden nach 24stündiger Inkubation zur Hypertrophieerfassung durch Bestimmung des Zellquerschnitts auf ihrer Schale in die Messkammer eines inversen Mikroskopes (Mikroskop BZ-800K) gelegt. Die Vergrößerung der Zellquerschnittsfläche (= cross sectional area) dient dabei als Hinweis für hypertrophes Zellwachstum. Hierzu fotografiert man pro Schale fünf Abschnitte bei einer 20fachen Vergrößerung mit Hilfe der Software „BZ-Observation Application“. Die in diesen Abschnitten vorhandenen Myozyten werden anschließend entlang ihrer Längsachse zur Längenbestimmung sowie an ihrem Mittelpunkt zur Breitenbestimmung ausgemessen. Pro Präparation erhält man somit circa 30 Zellen pro Bedingung. Zur Ermittlung der Zellquerschnittsfläche dient die Formel $\text{Fläche} = \text{Radius}^2 \times \pi$.

3.5 Statistik

Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Mittelwerte aus verschiedenen Präparationen werden zusammengefasst und aus diesen wiederum der Mittelwert bestimmt. Bei Vergleichen zwischen den Gruppen wird ein konventioneller t-Test herangezogen und Daten mit $p < 0,05$ als „voneinander statistisch signifikant unterschiedlich“ bezeichnet. Signifikante Ergebnisse werden mit einem (*) gekennzeichnet. Verwendetes Statistikprogramm war SPSS 16.0.

4 Ergebnisse

4.1 Akuteffekte von Endothelin und Endothelin plus PD142893 auf die lastfreie Zellverkürzung isolierter Herzmuskelzellen der Ratte

Nach Isolierung von Herzmuskelzellen männlicher Wistar-Ratten (siehe Abschnitt 3.1), wurde die kontraktile Ansprechbarkeit der Herzmuskellzellen nach einer Stunde Inkubation (siehe Abschnitt 3.2) mit ET erfasst. Hierzu wurden Konzentrationen von 0,01 μM – 1 μM verwendet. Es sollte sich erstens zeigen, ob ET einen Einfluss auf die lastfreie Zellverkürzung isolierter Herzmuskelzellen der Ratte nimmt. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob ET auch nach 15minütiger Vorinkubation mit dem ERA PD142893 (100 nM) weiterhin in der Lage ist, einen eventuellen Einfluss zu nehmen.

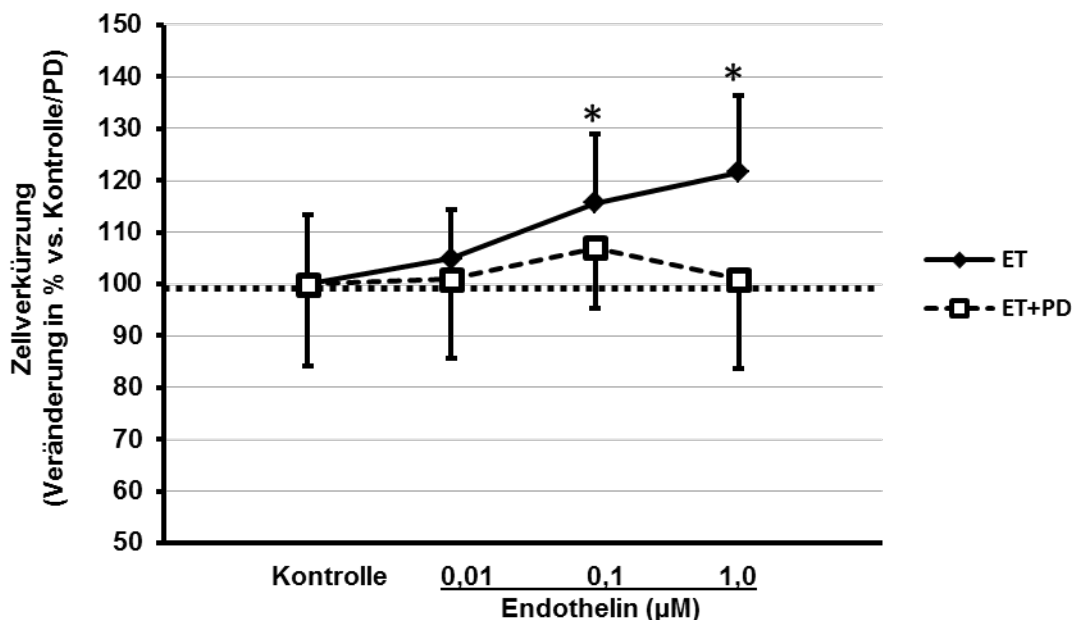


Abbildung 4.1.1

Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die lastfreie Zellverkürzung, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 21$ Zellen/Bedingung aus vier biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Es zeigte sich, dass ET nach einer Stunde Zellinkubation in der Lage ist, die lastfreie Zellverkürzung der Kardiomyozyten konzentrationsabhängig und bei Konzentrationen von 0,1 und 1,0 μM auch signifikant zu steigern (Abb. 4.1.1, schwarze Rauten: 0,01 μM : +4,9 %; 0,1 μM : +15,7 %; 1 μM +21,6 % im Vergleich zur Kontrolle). Diese konzentrationsabhängige Steigerung der lastfreien Zellverkürzung war in der Anwesenheit des ERA PD142893 nicht mehr zu beobachten.

(Abb. 4.1.1, weiße Kästen: ET 0,01 μ M + PD: +0,9 %; ET 0,1 μ M + PD: +6,9 %; ET 1 μ M + PD: +1 % im Vergleich zur Kontrolle).

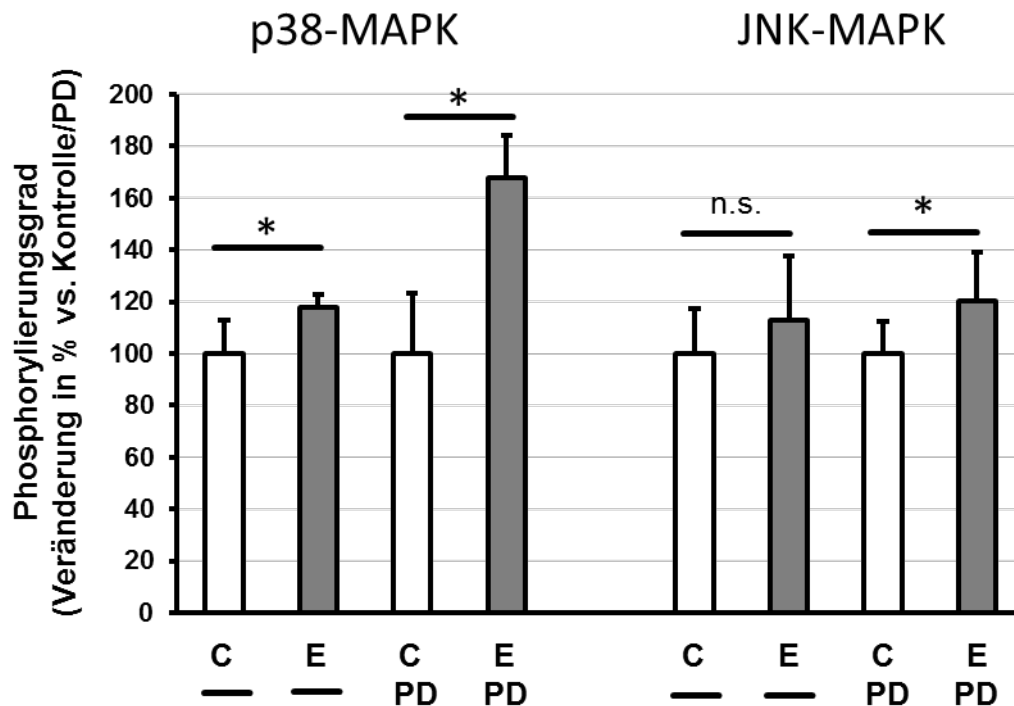


Abbildung 4.1.2

Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p38 und JNK nach einer Stunde Inkubation mit ET (1 μ M), jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind die prozentualen Unterschiede der Mittelwerte bezogen auf Kontrolle bzw. PD \pm Standardabweichung aus vier biologischen Replikaten. n.s.: nicht signifikant; * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Die Veränderungen in der lastfreien Zellverkürzung gingen mit Modifikationen im Phosphorylierungsgrad der die Myozytenfunktion beeinflussenden MAP-Kinasen p38 und JNK einher (Abb. 4.1.2). So wurde die p38 MAP-Kinase unter ET-Einfluss signifikant um +17,6 % bzw. bei Coinkubation mit PD142893 um +67,8 % phosphoryliert. Die JNK hingegen zeigte mit einer Veränderung von +12,8 % unter ET-Einfluss vs. Kontrolle nur einen Trend hin zur gesteigerten Phosphorylierung. Dieser Trend wurde bei Coinkubation mit PD142893 mit einer Steigerung um +20,2 % auch signifikant.

4.2 Zeitkinetik der lastfreien Zellverkürzung nach Inkubation mit Endothelin und Endothelin plus PD142893

Im zweiten Schritt wurde die kontraktile Ansprechbarkeit der Herzmuskellzellen über die Zeit nach 6, 24 und 48 Stunden Inkubation erfasst. Hierzu wurden jeweils die in Versuch 4.1. als signifikant wirksam beschriebenen Konzentrationen (ET: 1 μ M; PD: 100 nM) verwendet. Es sollte untersucht werden, ob sich der ET-abhängige Einfluss auf die kontraktile Ansprechbarkeit zeitabhängig verändert und gegebenenfalls, ob ein entstehender ET-Effekt erneut durch PD142893 inhibiert werden kann.

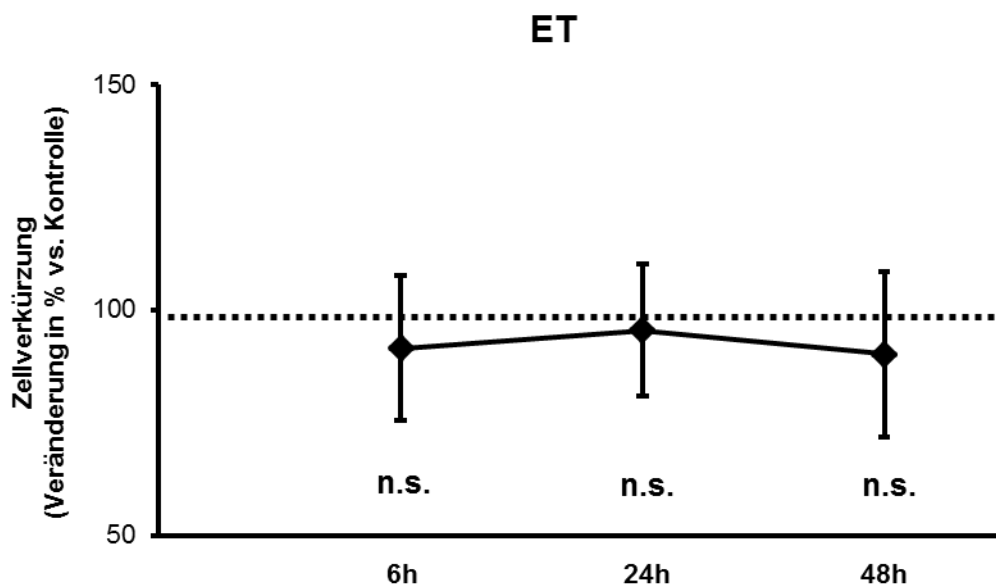


Abbildung 4.2.1

Zeit-Wirkungsbeziehung von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 21$ Zellen/Bedingung aus vier biologischen Replikaten. n.s.: nicht signifikant vs. Kontrolle der jeweiligen Inkubationszeit.

Es zeigte sich, dass sich der signifikant positive Effekt des ETs auf die kontraktile Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten nach einer Stunde Inkubation (Abb. 4.1.1.) über die Zeit zu einem Trend der negativen Beeinflussung umkehrt (Abb. 4.2.1: 6 h: -8,4 %; 24 h: -4,4 %; 48 h: -9,7 % jeweils vs. Kontrolle der jeweiligen Inkubationszeit).

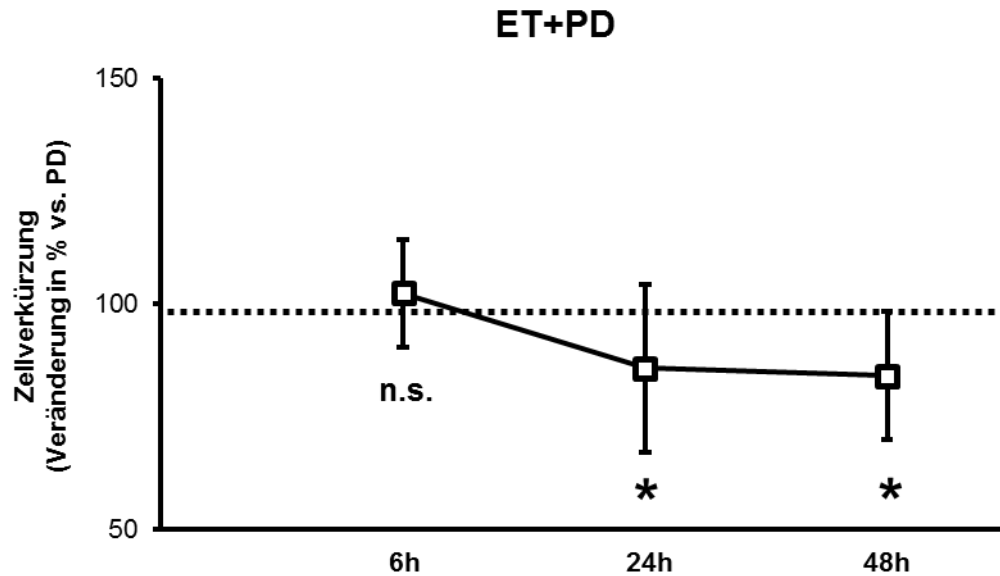


Abbildung 4.2.2

Zeit-Wirkungsbeziehung von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung nach Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 21$ Zellen/Bedingung aus vier biologischen Replikaten. n.s.: nicht signifikant bzw. *: $p \leq 0.05$ vs. PD der jeweiligen Inkubationszeit.

Der Effekt der negativen Beeinflussung durch ET wurde interessanterweise in den Langzeitinkubationen über 24 und 48 Stunden unter dem Einfluss des ERA PD142893 nicht inhibiert, sondern sogar verstärkt und erreichte so signifikante Werte (Abb. 4.2.2. 6 h: +2,4 %; 24 h: -14,3 %; 48 h: -16 % jeweils vs. PD).

4.3 Effekt von Endothelin und Endothelin plus PD142893 auf Zellbreite, -länge und -volumen sowie auf die MAP-Kinasen p42/p44

Nach Isolierung der Herzmuskelzellen (siehe Abschnitt 3.1) wurden im nächsten Schritt die Zellgrößenparameter der Herzmuskelzellen nach 24 Stunden Inkubation erfasst (siehe Abschnitt 3.4). Es sollte untersucht werden, ob ansteigende ET-Konzentrationen (0,01 μM – 1 μM) einen Effekt auf Zellbreite, -länge und -volumen adulter ventrikulärer Kardiomyozyten haben. Gleichzeitig sollte erfasst werden, ob der ERA PD142893 (100 nM) ähnlich zu den Versuchen zur kontraktilen Ansprechbarkeit (siehe Abschnitt 4.1.) in der Lage ist, einen eventuellen Effekt zu inhibieren.

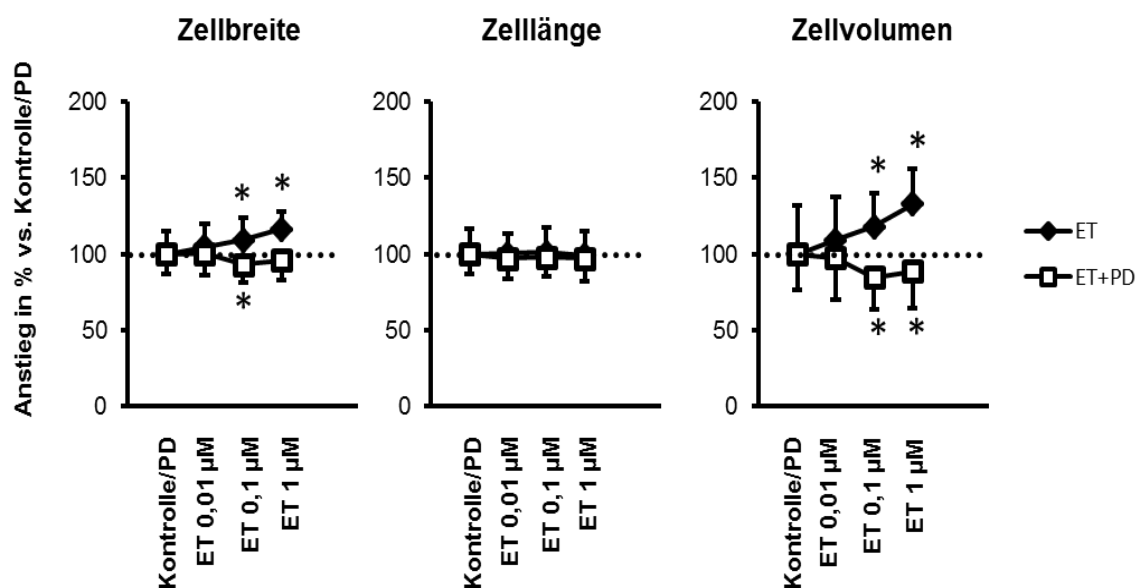


Abbildung 4.3.1

Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen nach 24 Stunden Inkubation, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 59$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Es zeigte sich, dass ET einen deutlichen, konzentrationsabhängigen und ab einer Konzentration von 0,1 μM auch signifikant hypertrophen Effekt auf die Zellbreite und Zellvolumen, nicht aber auf die Zelllänge hatte (Abb. 4.3.1, schwarze Rauten; jeweils in aufsteigender ET-Konzentration und jeweils vs. Kontrolle: Zellbreite: +4,7 %; +9,1 %, +16,3 %. Zelllänge: +0,3 %, +1,2 %, -0,87 %. Zellvolumen: +9,3 %, +17,8 %, +32,7 %). Dieser positiv hypertrophe Effekt auf Zellbreite und -volumen konnte in Anwesenheit von PD142893 nicht mehr nachgewiesen werden. In Konzentrationen von 1 μM (Zellbreite), respektive 1 und 10 μM (Zellvolumen) gab es interessanterweise sogar einen signifikant negativ hypertrophen Effekt (Abb. 4.3.1, weiße Kästen; jeweils in

aufsteigender ET-Konzentration, jeweils vs. PD: Zellbreite: +0,3 %; -6,7 %, -4 %. Zelllänge: -3 %, -1,9 %, -2,9 %. Zellvolumen: -2,7 %, -15,5 %, -11,3 %).

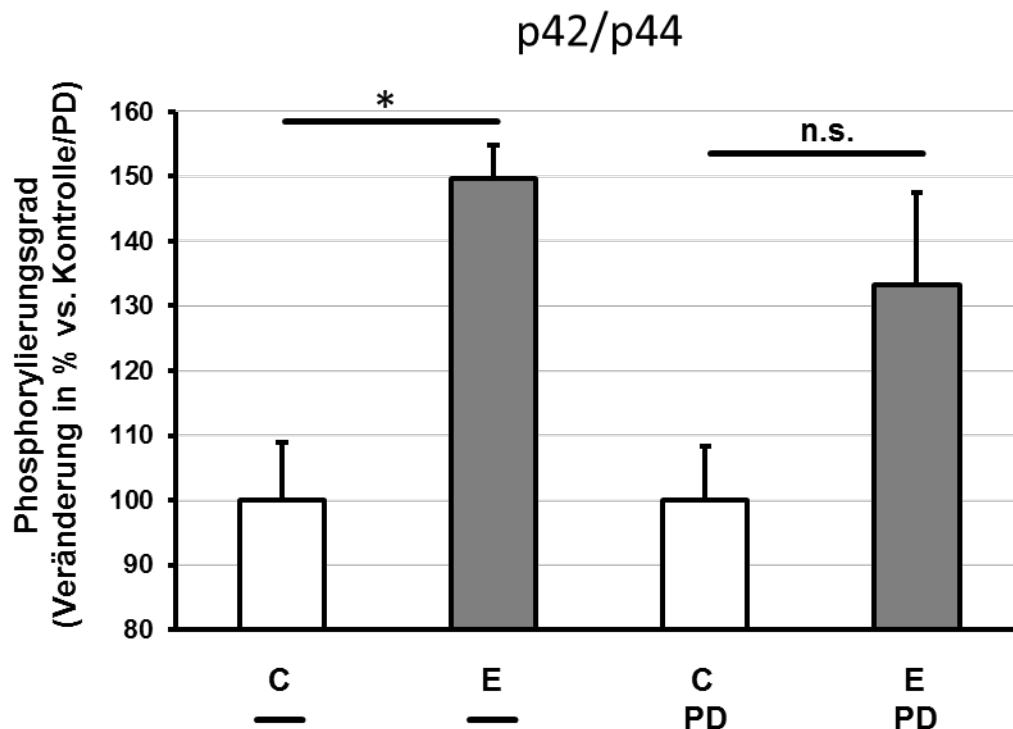


Abbildung 4.3.2

Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p42/44 nach einer Stunde Inkubation mit ET (1 μ M), jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind die prozentualen Unterschiede der Mittelwerte bezogen auf Kontrolle bzw. PD \pm Standardabweichung aus vier biologischen Replikaten. n.s.: nicht signifikant; * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD

Die Veränderungen in den Zellgrößenparametern gingen mit Modifikationen im Phosphorylierungsgrad der die Hypertrophie beeinflussenden MAP-Kinasen p42 und p44 einher. So wurden die MAP-Kinasen p42/p44 unter ET-Einfluss signifikant um +49,6 % bzw. in Anwesenheit von PD142893 um nicht signifikante +33,7 % phosphoryliert (Abb. 4.3.2).

4.4 Vergleich basaler Zellverkürzungs- und Zellgrößenparameter unter Normoglykämie und -tension mit Modellen der Hyperglykämie und chronischen Hypertension

Im nächsten Schritt wurden Zellverkürzungs- und Zellgrößenparameter isolierter Herzmuskelzellen von normoglykämischen-normotonen Wistarratten (Wistar NG) mit solchen aus zwei unterschiedlichen Pathologika-Modellen verglichen.

Das erste stellt ein *in-vitro*-Modell der Hyperglykämie dar, bei welchem dem „Standard“-Ausplattiermedium mit den isolierten Herzmuskelzellen normoglykämischer-normotoner Wistarratten zusätzlich D-Glucose hinzugesetzt wird (Wistar HG). Die Endkonzentration des die Myozyten umgebenden Mediums beträgt so $30 \text{ mM} \pm 541 \text{ mg/dl}$ D-Glucose.

Das zweite ist durch die Gewinnung von isolierten Herzmuskelzellen aus sogenannten spontan hypertensiven Wistar-Ratten (SHR), also einem Modell für chronische Hypertension, gekennzeichnet.

Erfasst und verglichen wurden das basale Verhalten der kontraktilen Ansprechbarkeit (nach einer und 24 Stunden Kultur) und die basalen Zellgrößenparameter der Herzmuskelzellen (nach 24 Stunden Kultur) der drei Modelle (Wistar NG, SHR und Wistar HG).

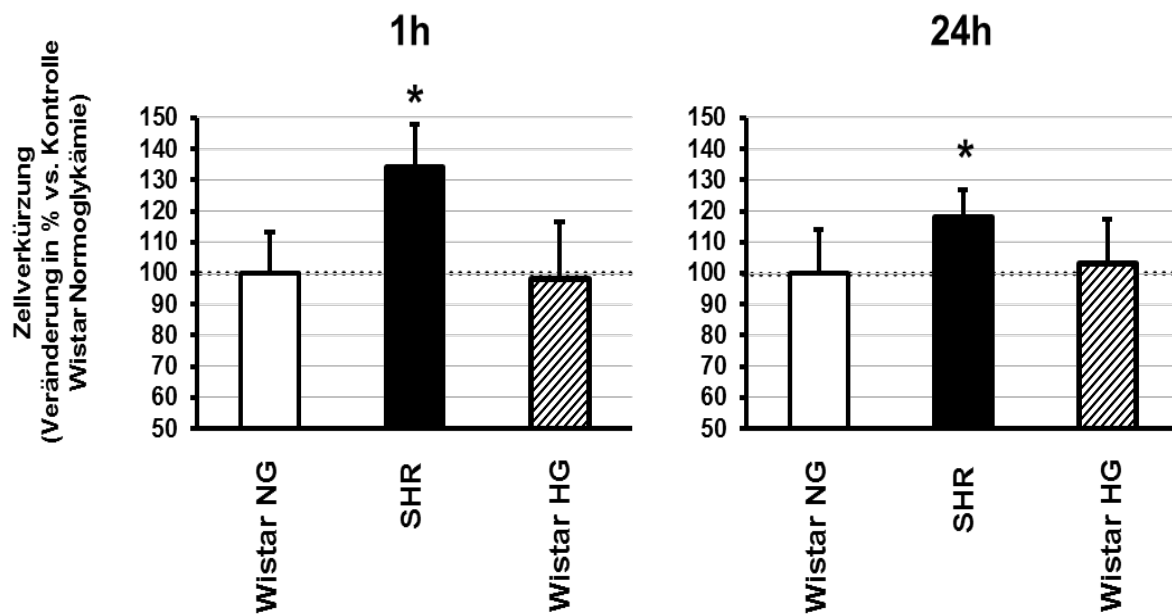


Abbildung 4.4.1

Darstellung der lastfreien Zellverkürzung unter physiologischen Bedingungen (Wistar NG) im Vergleich zu chronischer Hypertension (SHR) und Hyperglykämie (Wistar HG). Ergebnisse nach einer und 24 Stunden Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 23$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. *: $p \leq 0.05$ vs. Wistar NG.

Sowohl nach akuter (eine Stunde, Abb. 4.4.1 links) als auch nach Langzeitinkubation (24 Stunden, Abb. 4.4.1 rechts) zeigte sich, dass Kardiomyozyten, welche aus SHR-Ratten isoliert wurden, eine basal signifikant gesteigerte lastfreie Zellverkürzung gegenüber Myozyten von normoglykämischen Wistar-Ratten aufwiesen (1 h: +34,3 %; 24 h: +18,3 %).

Kardiomyozyten von Wistarratten, welche für eine bis 24 Stunden hyperglykämischen Bedingungen ausgesetzt waren, zeigten keine signifikanten Unterschiede zu normoglykämischen Bedingungen (1 h: -1,62 %; 24 h: +3 %).

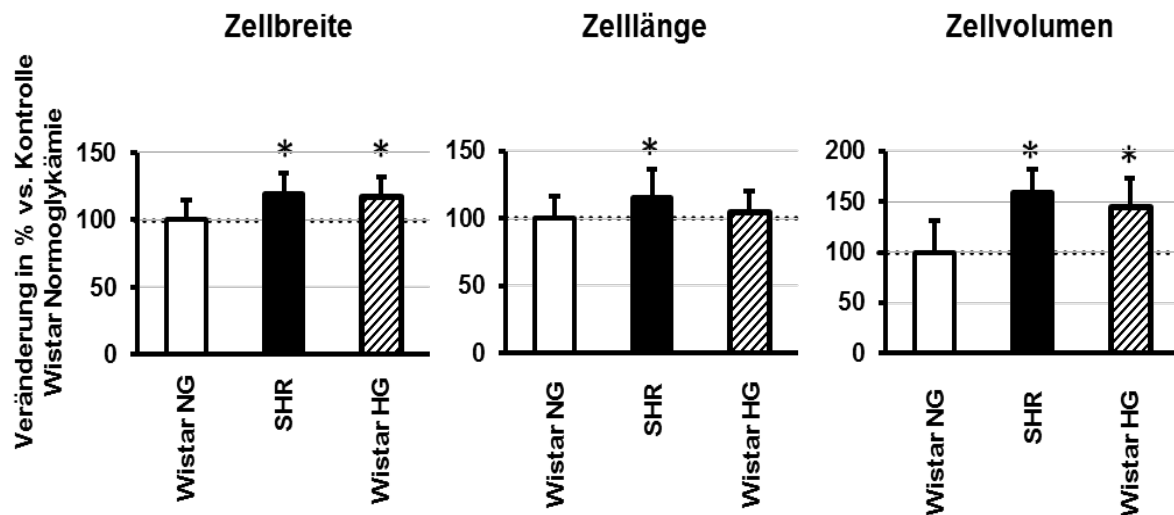


Abbildung 4.4.2

Darstellung der Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen unter physiologischen Bedingungen (Wistar NG) im Vergleich zu chronischer Hypertension (SHR) und Hyperglykämie (Wistar HG) nach 24 Stunden Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 28$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Wistar NG.

Bei der Untersuchung einer möglichen Hypertrophie der SHR-Kardiomyozyten nach 24 Stunden Zellkultur zeigten diese sowohl in Zellbreite (+19,1 %), Zelllänge (+16,1 %) als auch im Zellvolumen (+59,5 %) signifikant gesteigerte Zellgrößenparameter (Abb. 4.4.2, SHR). Auch Kardiomyozyten unter hyperglykämischen Bedingungen zeigten einen signifikanten Anstieg in Zellbreite (+17,6 %) und Zellvolumen (+44,6 %), nicht jedoch in der Zelllänge (+5,1 %) (Abb. 4.4.2, Wistar HG).

4.5 Endothelin- und PD142893-abhängige Veränderungen der Zellverkürzung, Zellgröße und MAPK-Aktivierung in SHR-Kardiomyozyten

In der nächsten Versuchsreihe wurden die Herzmuskelzellen „Spontan Hypertensiver Ratten“ (SHR) isoliert (siehe Abschnitt 3.1). Zuerst wurden die akute (eine Stunde Inkubation) und chronische (24 Stunden Inkubation) kontraktile Ansprechbarkeit der Herzmuskelzellen (siehe Abschnitt 3.4) erfasst. Hierzu wurden wieder die sich als wirksam erwiesenen Konzentrationen verwendet (ET: 1 μ M; PD142893: 100 nM).

Es sollte sich nun zeigen, ob ET auch in einem Modell der chronischen Hypertension einen Einfluss auf die lastfreie Zellverkürzung isolierter Herzmuskelzellen nimmt. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob ein eventueller Einfluss PD142893-sensibel ist.

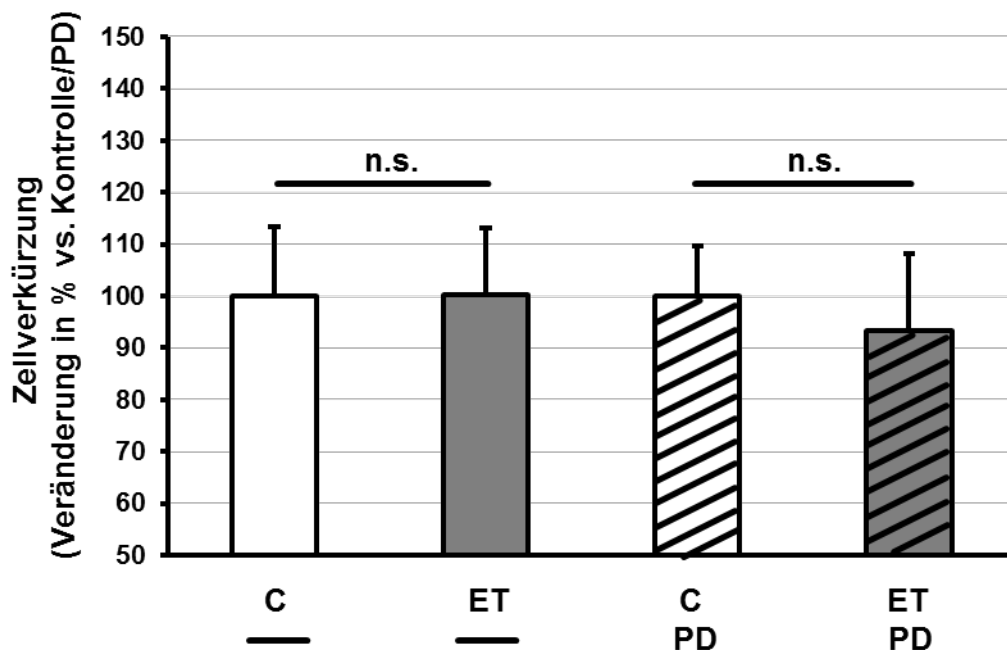


Abbildung 4.5.1

Akuteffekt (Inkubation eine Stunde) von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung von SHR-Kardiomyozyten, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 32$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

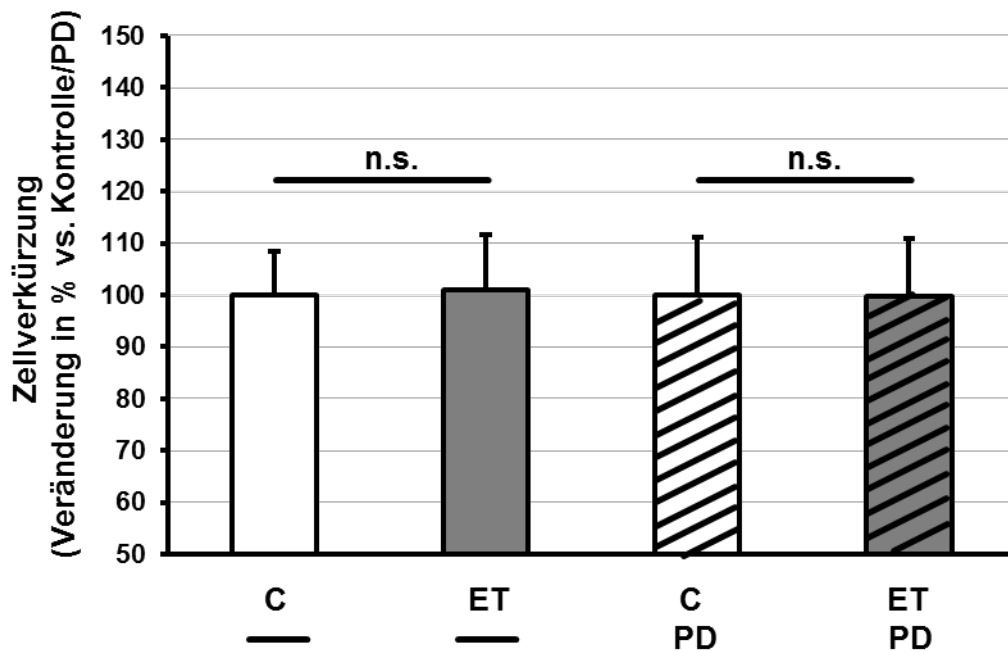


Abbildung 4.5.2

Chronischer Effekt (Inkubation 24 Stunden) von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung von SHR-Kardiomyozyten. Jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 33$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Sowohl nach akuter (Abb. 4.5.1) als auch nach Langzeitinkubation (Abb. 4.5.2) zeigte sich, dass ET im Modell der chronischen Hypertension nicht mehr in der Lage ist, die lastfreie Zellverkürzung der Kardiomyozyten signifikant zu verändern (akut: +0,2 %, chronisch: +1,1 % jeweils vs. Kontrolle). Das Gleiche gilt für die kontraktile Ansprechbarkeit in Anwesenheit von PD142893 (akut -6,75 %, chronisch: -0,1 % jeweils vs. PD).

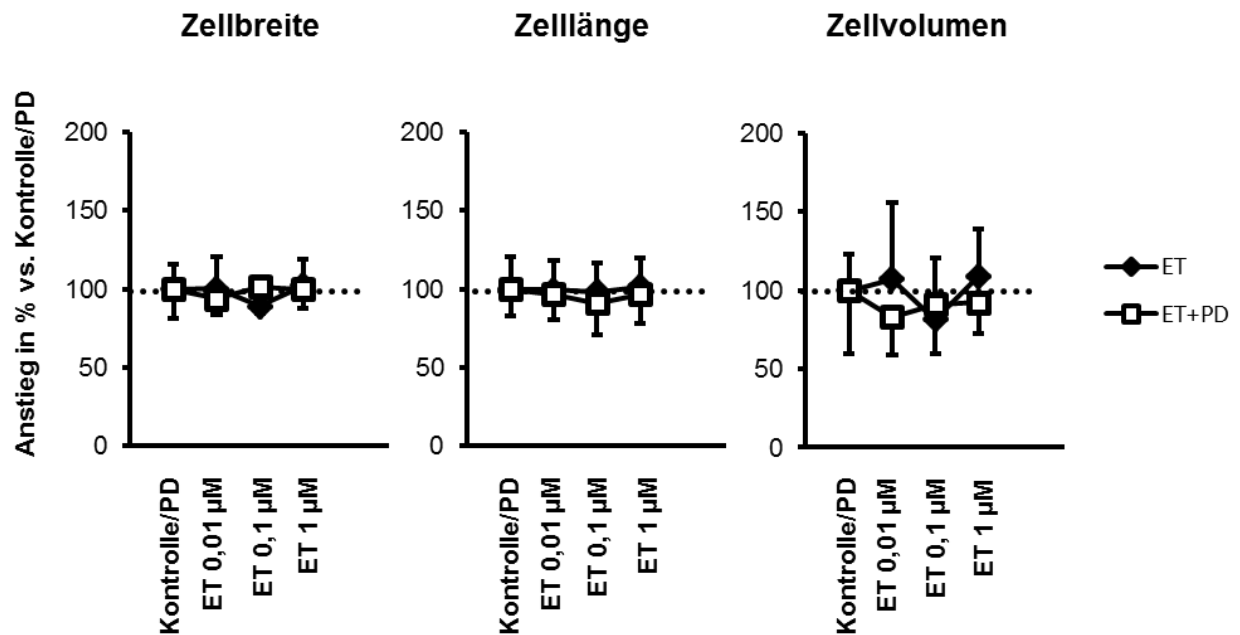


Abbildung 4.5.3

Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen von SHR-Kardiomyozyten nach 24 Stunden Inkubation, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 24$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Auch bei der Untersuchung einer möglichen Hypertrophie der SHR-Kardiomyozyten nach 24 Stunden ET-Inkubation (siehe Abschnitt 3.4) zeigte sich kein signifikanter Effekt der ansteigenden ET-Konzentrationen (0,01 μ M – 1 μ M) auf Zellbreite, -länge und -volumen mehr. Auch die gleichzeitige Anwesenheit des ERA PD142893 (100 nM) nahm keinen weiteren Einfluss auf die Zellgrößenparameter (Abb. 4.5.3).

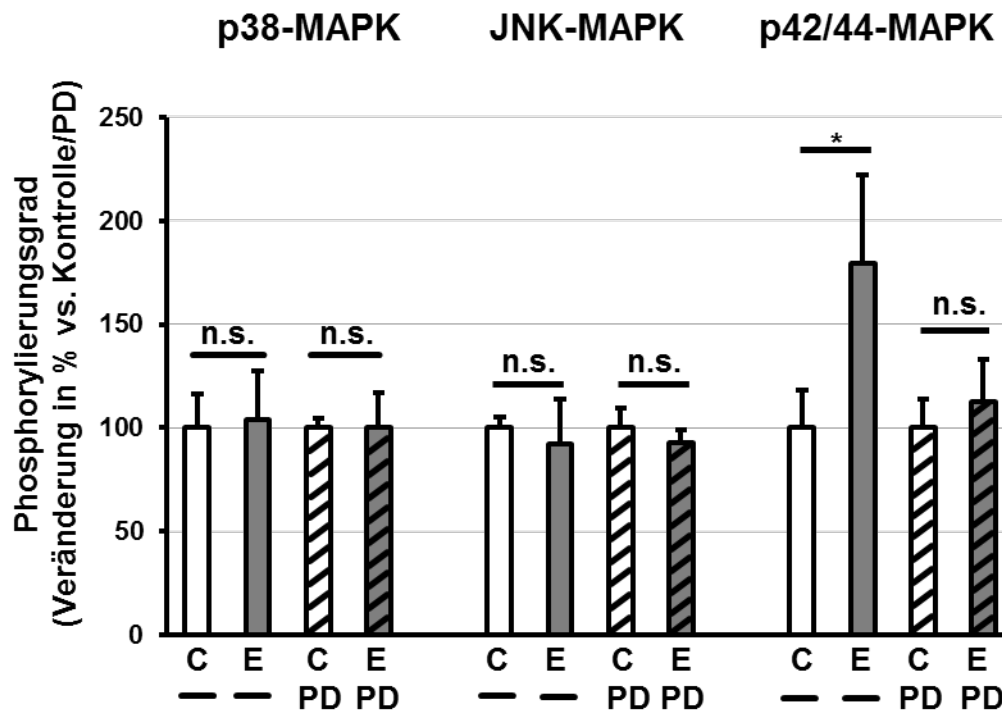


Abbildung 4.5.4

Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p38, JNK und p42/44 von SHR-Kardiomyozyten nach 1 Stunde Inkubation mit ET (1 μ M), jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893 (100 nM). Dargestellt sind die prozentualen Unterschiede der Mittelwerte bezogen auf Kontrolle bzw. PD \pm Standardabweichung aus zwei biologischen Replikaten. n.s.: nicht signifikant; * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Die fehlenden Veränderungen in der lastfreien Zellverkürzung gingen auch mit fehlenden signifikanten Modifikationen des Phosphorylierungsgrads der die Myozytenfunktion beeinflussenden MAP-Kinasen p38 und JNK einher (Abb. 4.5.4 links und Mitte).

Die die Zellhypertrophie beeinflussenden p42/p44-MAP-Kinasen hingegen zeigten unter ET-Einfluss mit PD-Vorinkubation einen Trend und ohne PD-Vorinkubation einen signifikanten Effekt zur vermehrten Phosphorylierung (Abb. 4.5.4 rechts). Diese Zunahme im Phosphorylierungsgrad ging jedoch nicht, wie vorher beschrieben, mit einer weiteren Größenzunahme (Abb. 4.5.3) der schon basal hypertrophierten Zellen einher (Abb. 4.4.2).

4.6 Einfluss von Hyperglykämie auf die Endothelin- und PD142893-abhängigen Veränderungen der Zellverkürzung, Zellgröße und MAPK-Aktivierung

In der letzten Versuchsreihe wurden erneut die Herzmuskelzellen männlicher Wistar-Ratten (siehe Abschnitt 3.1) isoliert, diese nun jedoch unter hyperglykämischen Bedingungen untersucht (30 mM D-Glucose \pm 541 mg/dl). Zunächst wurde die akute (eine Stunde Inkubation) und chronische (24 Stunden Inkubation) kontraktile Ansprechbarkeit der Herzmuskelzellen erfasst (siehe Abschnitt 3.4). Hierzu wurden wieder die sich als wirksam erwiesenen Konzentrationen verwendet (ET: 1 μ M; PD142893: 100 nM). Es sollte sich nun zeigen, ob ET auch in einem Modell Hyperglykämie einen Einfluss auf die lastfreie Zellverkürzung isolierter Herzmuskelzellen nimmt. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob ein eventueller Einfluss PD142893-sensibel ist.

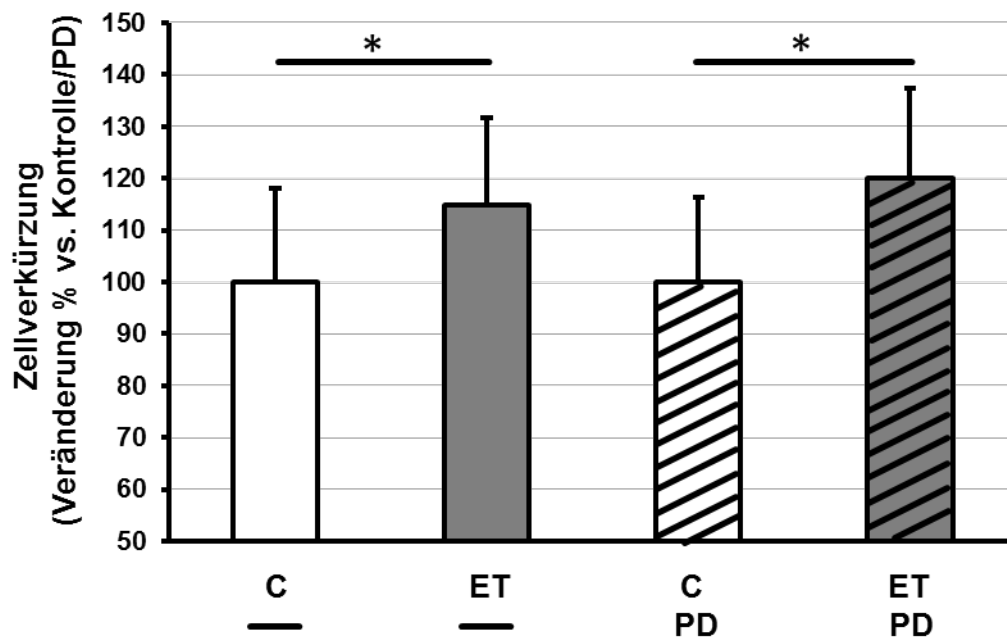


Abbildung 4.6.1

Akuteffekt (Inkubation 1 Stunde) von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens n = 30 Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. *: $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Nach einer Stunde Inkubation (Abb. 4.6.1) zeigte sich, dass ET, wie schon bei Normoglykämie, auch unter hyperglykämischen Bedingungen in der Lage ist, die lastfreie Zellverkürzung der Kardiomyozyten signifikant positiv zu beeinflussen (+15 % vs. Kontrolle).

Während PD142893 bei Normoglykämie in der Lage war, diesen positiven Einfluss zu blocken, war dies unter hyperglykämischen Bedingungen nicht mehr der Fall (+20 % vs. PD).

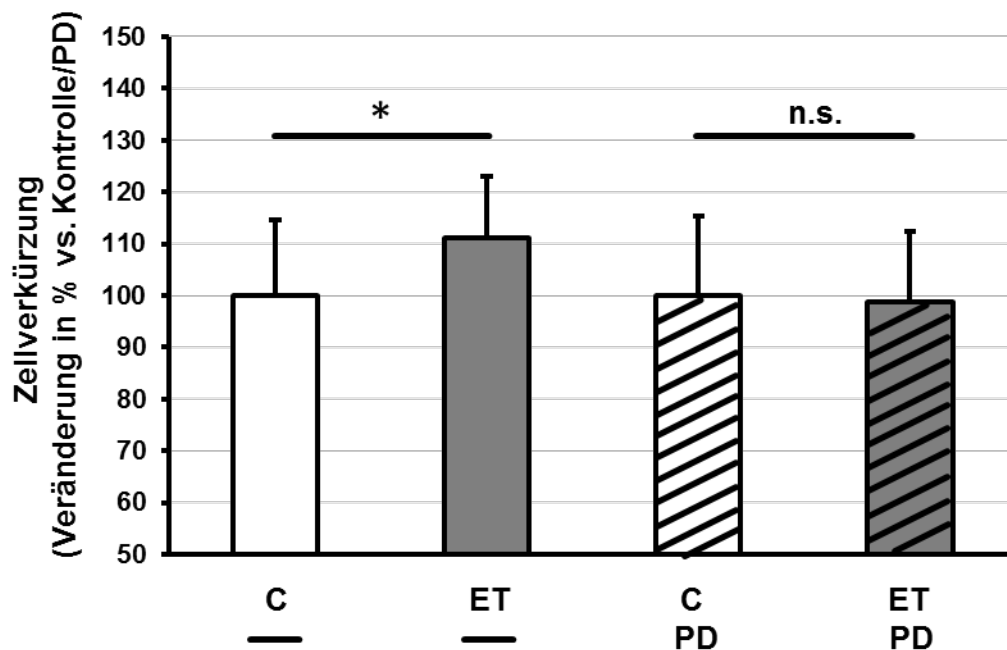


Abbildung 4.6.2

Chronischer Effekt (Inkubation 24 Stunden) von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 32$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Nach 24 Stunden Inkubation zeigte sich, dass, entgegen des Effektes bei Normoglykämie, ET unter hyperglykämischen Bedingungen die lastfreie Zellverkürzung der Kardiomyozyten weiterhin signifikant positiv beeinflusst (Abb. 4.6.2 links; +11 % vs. Kontrolle). Der gezeigte ET-Effekt konnte durch Vorinkubation mit PD142893 nicht mehr beobachtet werden und wurde auch nicht – wie unter Normoglykämie - verstärkt (Abb. 4.6.2 rechts; -1 % vs. PD).

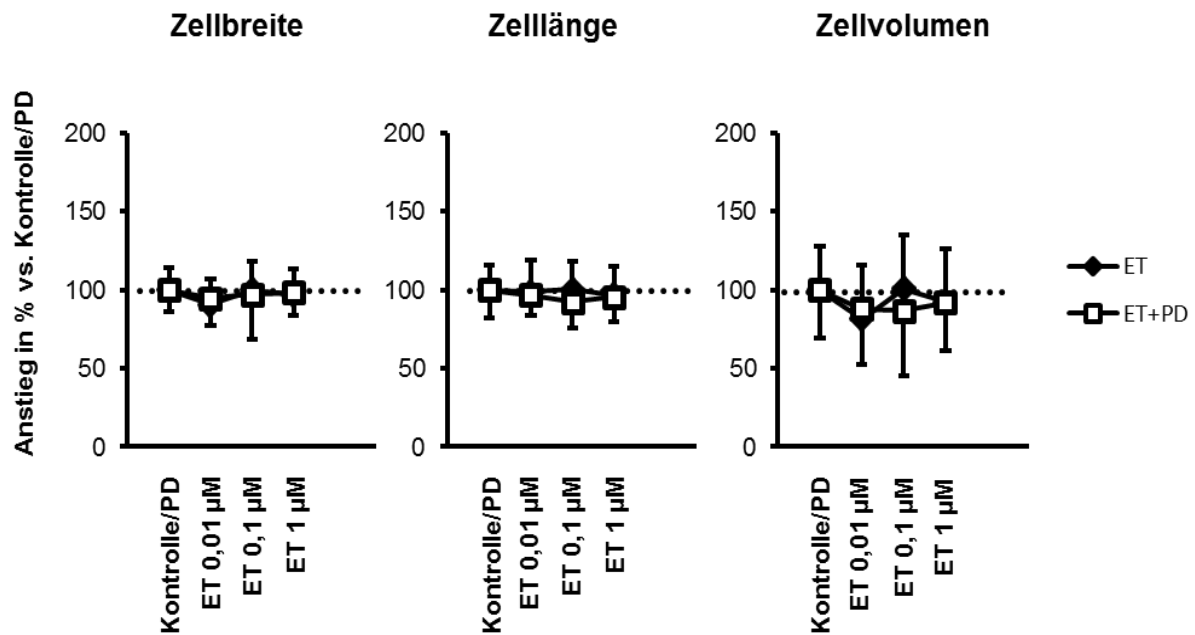


Abbildung 4.6.3

Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen nach 24 Stunden Inkubation unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n = 44$ Zellen/Bedingung aus zwei biologischen Replikaten. * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Bei der Untersuchung einer möglichen Hypertrophie der Kardiomyozyten unter hyperglykämischen Bedingungen nach 24 Stunden ET-Inkubation (siehe Abschnitt 4.3.4) zeigte sich kein signifikanter Effekt der ansteigenden ET-Konzentrationen (0,01 μ M – 1 μ M) auf Zellbreite, -länge und -volumen mehr. Auch die gleichzeitige Anwesenheit von PD142893 (100 nM) nahm keinen weiteren Einfluss auf die Zellgrößenparameter (Abb. 4.4.3).

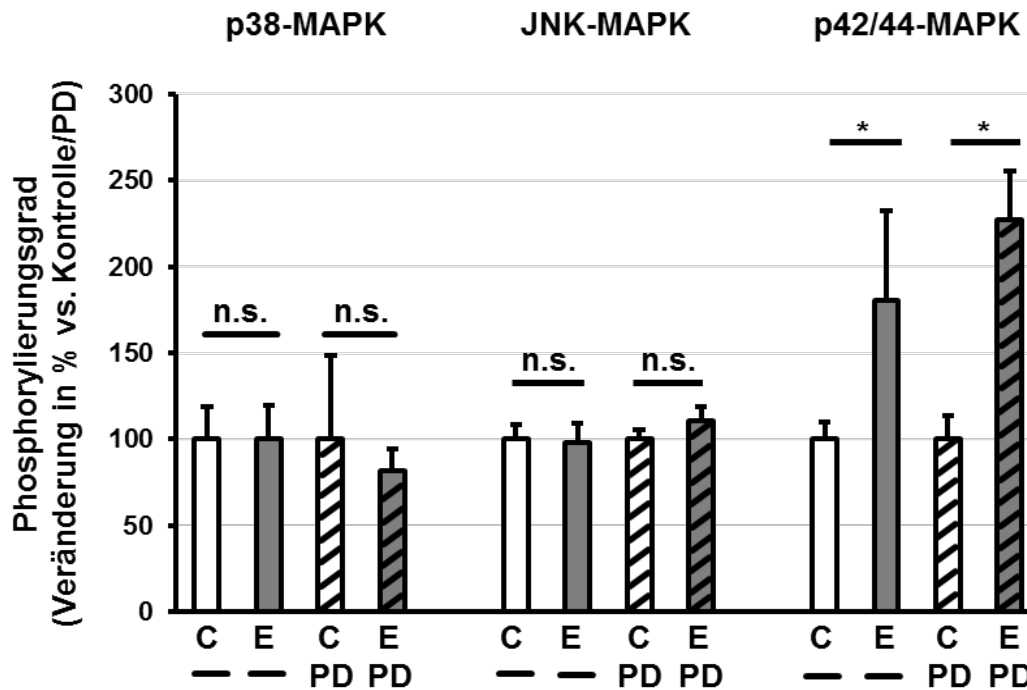


Abbildung 4.6.4

Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p38, JNK und p42/44 nach einer Stunde Inkubation unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893. Dargestellt sind die prozentualen Unterschiede der Mittelwerte bezogen auf Kontrolle bzw. PD \pm Standardabweichung aus zwei biologischen Replikaten. n.s.: nicht signifikant; * : $p \leq 0.05$ vs. Kontrolle/PD.

Die Veränderungen in der lastfreien Zellverkürzung nach einer und 24 Stunden gingen dieses Mal ohne signifikante Modifikationen des Phosphorylierungsgrads der die Myozytenfunktion beeinflussenden MAP-Kinasen p38 und JNK einher (Abb. 4.6.4 links und Mitte).

Die die Zellhypertrophie beeinflussenden p42/p44-MAP-Kinasen hingegen zeigten unter ET-Einfluss sowohl ohne als auch mit PD-Vorinkubation eine signifikant stärkere Phosphorylierung an (Abb. 4.6.4 rechts). Diese Zunahme im Phosphorylierungsgrad ging jedoch nicht, wie vorher beschrieben, mit einer weiteren Größenzunahme (Abb. 4.6.3) der schon basal in Breite und Volumen hypertrophierten Zellen einher (Abb. 4.4.2).

5 Diskussion

Als zunächst hilfreiche Kompensationsmechanismen einer sich entwickelnden (chronischen) Herzinsuffizienz gelten unter anderem das veränderte myokardiale Kontraktionsverhalten sowie die kardiale Hypertrophie (s. Abschnitt 1.1.4). Diese führen jedoch, wie schon beschrieben, im Verlauf zu einer Verschlechterung der hämodynamischen Situation und somit zu einem Eintritt in einen Circulus vitiosus und dadurch zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz. Die genannten Kompensationsmechanismen werden unter anderem durch das ET-System beeinflusst, wodurch dieses einen möglichen Ansatzpunkt für eine Modulation einer sich entwickelnden Herzinsuffizienz darstellt.

In der vorliegenden Studie wurde die Beeinflussung der kontraktilen Ansprechbarkeit und der Myokardhypertrophie durch ET sowie deren Modifikationen durch den spezifischen ET_A/ET_{B1} -Rezeptorantagonisten PD142893 untersucht. Ein Schwerpunkt wurde hierbei auf die Frage gelegt, ob PD142893-sensitive (ET_{B1}) und PD142893-resistente (ET_{B2}) Rezeptoren unterschiedlich in die Entwicklung und das Fortschreiten der genannten Faktoren einwirken. Da ein genetischer Knockout des ET_B -Rezeptors die Expression beider ET_B -Rezeptor blockieren würde, wurde zur Untersuchung der Fragestellung der Subtyp-Differenzierung dieser pharmakologische Versuchsansatz gewählt.

Außerdem war von besonderem Interesse, ob kardiale Stressbedingungen, wie sie im Kontext von Diabetes (Hyperglykämie) und chronischer Hypertension auftreten, in der Lage sind, die Ansprechbarkeit von ET-Rezeptoren auf ET und dessen unspezifischen Rezeptorantagonisten PD142893 zu verändern. Die Idee zu den Fragestellungen dieser Arbeit basieren auf Erkenntnissen früherer Experimente [73–76], in denen die Theorie einer Subdifferenzierung des ET_B -Rezeptors - teilweise anhand einer ET_A - ET_{B1} -spezifischen Rezeptorblockung des ERAs PD142893 - postuliert wurde.

5.1 Hauptbefunde

- ET verursacht einen zeitabhängigen, kardiodepressiven Effekt über eine ET_{B2}-Rezeptor-abhängigen Aktivierung des JNK-Signalwegs.
- ET bewirkt einen prohypertrophen Effekt via einer ET_A/ET_{B1}-Rezeptor-abhängigen Aktivierung des p42/44-Signalwegs und zeigt über ET_{B2} auch negativ hypertrophe Effekte.
- Modelle der chronischen Hypertension wie auch der Hyperglykämie zeigen unter anderem aufgrund modifizierter Rezeptorenkopplungen differenzierte Effekte in der lastfreien Zellverkürzung und den Zellgrößenparametern.

5.2 Endothelin steigert im Akutexperiment über ET_A/ET_{B1} konzentrationsabhängig die lastfreie Zellverkürzung

In der vorliegenden Studie zeigte sich erwartungsgemäß ein konzentrationsabhängiger, positiv-kontraktiler ET-Akuteffekt unter physiologischen Bedingungen (Abb. 4.1.1). Dieser ist gut untersucht und deckt sich mit vorangegangenen Studien. So ist bekannt, dass der positiv-kontraktile Effekt auf einer ET_A-Stimulation, einer PKC- und ROS-abhängigen Aktivierung des NHE mit folgendem pH-Anstieg und schließlich einem steigendem Calciumtransienten beruht [23, 95, 116, 122, 125, 171–176]. Da es sich bei dem ERA PD142893 u.a. um einen ET_A-Rezeptorblocker handelt und der oben genannte ET-Effekt wie beschrieben ET_A-vermittelt ist, konnte auch die positive kontraktile Ansprechbarkeit wie erwartet durch PD142893 geblockt werden (Abb. 4.1.1.).

In den vorliegenden Versuchen gingen die ET-abhängigen Veränderungen in der lastfreien Zellverkürzung mit Modifikationen im Phosphorylierungsgrad der die Myozytenfunktion beeinflussenden MAP-Kinasen p38 und JNK einher (Abb. 4.1.2). Hiermit vergleichbar ist die von Pribnow et al. untersuchte JNK-Aktivierung und Calciumtransienten-Modifikation nach ET-Aktivierung in Rattenfibroblasten [177]. In den vorliegenden Ergebnissen wurde die unter ET signifikante p38-MAPK-Phosphorylierung bei Coinkubation mit PD142893 nochmals verstärkt. Gleiches gilt für die JNK-Phosphorylierung, bei der ein vorliegender Trend unter ET-Einfluss bei Coinkubation mit PD142893 signifikant wurde. In beiden Fällen wurde der ET-abhängige Phosphorylierungsgrad unter der Co-Präsenz von PD142893 also nicht nur

nicht geblockt, sondern sogar deutlich verstärkt. Dieses deutet in beiden Fällen auf eine ET_{B2}-Rezeptorsubtyp-abhängige Phosphorylierung hin, die im Falle der JNK erst unter ET_A/ET_{B1}-Rezeptorblockung betont und somit erkennbar wird. Beide Zunahmen in der Phosphorylierung scheinen nicht mit dem akuten PD142893-vermittelten Block des akuten kontraktile ET-Effekts in Zusammenhang zu stehen.

5.3 Endothelin verursacht einen zeitabhängigen, kardiodepressiven Effekt via einer ET_{B2}-Rezeptor-abhängigen Aktivierung des JNK-Signalwegs

Entgegen der Akutversuche zeigte sich, dass sich der signifikant positive-kontraktile Effekt des ETs nach einer Stunde Inkubation (Abb. 4.1.1.) in den Langzeitinkubationen über 24 und 48 Stunden zu einem Trend der negativen Beeinflussung umkehrt (Abb. 4.2.1). Interessanterweise wird dieser negativ-kontraktile Effekt unter Einfluss von PD142893 nicht nur nicht inhibiert, sondern sogar verstärkt und erreicht so signifikante Werte (Abb. 4.2.2). Somit wurde ein angedeuteter ET-induzierter kardiodepressiver Langzeiteffekt unter normoglykämien-normotensiven Bedingungen erst durch Inhibition der ET_A/ET_{B1}-Rezeptoren aufgedeckt. Der Vermittler dieses kardiodepressiven Effektes ist nach ET_A/ET_{B1}-Rezeptorenblockung folglich am wahrscheinlichsten der ET_{B2}-Rezeptor. Dieses wäre auch konsistent mit Theorien vorheriger Studien, in denen ein negativ-kontraktile Effekt des ETs nach ET_B-Rezeptorenaktivierung postuliert wurde [122, 178]. Insgesamt sind negativ-kontraktile Antworten von Kardiomyozyten nach ET-Rezeptorstimulation weniger gut dokumentiert, werden aber immer wieder in verschiedenen Spezies – inklusive Rattenzellkulturen – gefunden [119–123]. Es gibt wenige Informationen darüber, wie ET diesen Effekt hervorruft. Vorgeschlagen wurde, dass hierfür, als Folge der schon angesprochenen Aktivierung des ET_B-Rezeptors, eine Natrium-Calcium-Austauscher-getriggerte (NCX) Verringerung des Calciumtransienten verantwortlich ist [122, 179].

In Kombination mit dem Ergebnis der Abb. 4.1.2., dass die JNK nur unter ET-/PD142893-Coinkubation signifikant phosphoryliert wurde, lassen die oben genannten Daten vermuten, dass die JNK an der ET_{B2}-abhängigen Induktion von kardiodepressiven Effekten beteiligt ist. Vermutlich wird ein kontraktile Effekt einer JNK-Phosphorylierung also erst mit einem gewissen Zeitabstand mit der Möglichkeit der downstream der JNK gelegenen Modifikationen z.B. an Enzymen und Proteinen des Zellkontraktionsapparates signifikant. Tatsächlich zeigte ET in einem

Folgeexperiment bei gleichzeitiger direkter Inhibition der JNK erneut einen positiv-kontraktilen, PD142893-sensitiven Effekt – vermutlich, indem der kardiodepressive, ET_{B2} - und JNK-vermittelte Effekt wieder abgeschwächt wurde (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die ET_{B2} -abhängige Aktivierung der JNK wurde also durch spezifische Inhibitoren abgeschwächt und somit die ET_A/ET_{B1} -abhängige, positiv-kontraktile Antwort wiederhergestellt.

5.4 Endothelin verursacht einen prohypertrophen Effekt via einer ET_A/ET_{B1} -Rezeptor-abhängigen Aktivierung des p42/44-Signalwegs und zeigt über ET_{B2} auch negativ hypertrophe Effekte

In den vorliegenden Versuchen zeigte ET deckungsgleich mit vorangegangenen Studien einen konzentrationsabhängigen, prohypertrophen Effekt auf Zellbreite und Zellvolumen [151, 152] (Abb. 4.3.1). Dieser wurde von PD142893 nicht nur geblockt, sondern es zeigten sich unter Coinkubation interessanterweise auch signifikant negativ-hypertrophe Effekte (Abb. 4.3.1). Da somit eine ET_A/ET_{B1} -Rezeptorblockade den prohypertrophen Effekt des ETs vollständig aufhebt, kann zunächst postuliert werden, dass sich ET_{B2} -Rezeptoren nicht an der Entwicklung einer ET-vermittelten Hypertrophie beteiligen. Vermutlich ist also auch hier der ET_{B2} -Rezeptor der entscheidende Vermittler einer ET_A/ET_{B1} entgegengesetzten Wirkung – in diesem Falle einer negativen Hypertrophie. Schon seit Mullan et al. 1997 wurde vermutet, dass bei ventrikularen Kaninchenmyozyten sowohl ET_A -, als auch ET_B -Rezeptoren an der Entwicklung einer Hypertrophie beteiligt sind [180]. Gleiches konnte später auch an Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden [181]. Lee et al. postulierten schließlich, dass an der Entwicklung und Progression einer Kardiomyozyten-Hypertrophie verschiedene ET_B -Rezeptoren beteiligt sein müssen [76]. In Kombination mit den vorliegenden Ergebnissen - wenn auch spezieübergreifend - vermittelt somit zusammenfassend am Wahrscheinlichsten der ET_{B1} -Rezeptor prohypertrophe, der ET_{B2} -Rezeptor antihypertrophe Effekte.

Der prohypertrophe Effekt des ETs ging mit einer signifikanten Steigerung im Phosphorylierungsgrad der die Hypertrophie positiv beeinflussenden MAP-Kinasen p42 und p44 einher. Durch PD142893 konnte diese Phosphorylierung auf nicht-signifikante Werte reduziert werden (Abb. 4.3.2). Beide Ergebnisse sind konsistent mit

vorhergehenden Berichten und etablierten Signalwegen, welche zu einer ET-abhängigen kardialen Hypertrophie führen [182]. Andere Studien konnten zusätzlich zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen auch die Stresskinasen p38 und JNK eine Rolle in der kardialen Hypertrophie spielen können [158, 183–186]. Diese Studien fanden jedoch im Gegensatz zu der vorliegenden Untersuchung entweder an neonatalen Kardiomyozyten-Zellkulturen statt und/oder die Hypertrophie war α -Agonisten und nicht ET-induziert.

5.5 Endothelin und PD142893 zeigen unter anderem aufgrund modifizierten Rezeptorenkopplungen an SHR-Kardiomyozyten weder Effekte in der lastfreien Zellverkürzung, noch bei den Zellgrößenparametern

In den vorliegenden Ergebnissen zeigten SHR- gegenüber normotensiven Wistar-Kardiomyozyten eine basal signifikant gesteigerte lastfreie Zellverkürzung (Abb. 4.4.1). Dies deckt sich mit vorangegangenen Studien [187]. Aufgrund der gesteigerten Nachlast pathophysiologisch zu erwarten und wie auch schon in der Literatur beschrieben [76, 188], zeigte sich auch in den vorliegenden Ergebnissen eine alle Zellgrößenparameter umfassende basale Hypertrophie der SHR- versus Wistar-Kardiomyozyten (Abb. 4.4.2).

Weder akut noch chronisch waren ET oder eine ET/PD142893-Coinkubation im Modell der chronischen Hypertension dazu in der Lage, die lastfreie Zellverkürzung der Kardiomyozyten signifikant zu verändern (Abb. 4.5.1, 4.5.2). Für den fehlenden positiv-kontraktilen Akuteffekt könnte die in SHR-Tieren durch Drucküberlastung schon basal gesteigerte kontraktile Ansprechbarkeit verantwortlich sein, die eine eventuelle Rezeptoraktivierung nicht signifikant werden lässt (Abb. 4.4.1). Eine weitere Erklärung wäre eine modifizierte bzw. fehlende Rezeptorenkopplung (s.u.). Da auch der unter physiologischen Bedingungen negativ-kontraktile Langzeiteffekt nicht mehr zu sehen ist, scheint zusätzlich eine Modifikation in der ET_{B2}-Rezeptorenkopplung vorzuliegen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie wurde in einer anderen, methodentechnisch sehr ähnlichen Untersuchung eine positive Ansprechbarkeit der Zellverkürzung isolierter SHR-Kardiomyozyten auf ET beschrieben [189]. Eine Erklärung könnte sein, dass in der hier vorliegenden Studie die verwendete Konzentration von einem Mikromolar drei Zehnerpotenzen über der von Delbridge et al. verwendeten ein-nanomolaren Konzentration liegt. Auch Delbridge zeigte ab 10 nM

einen abnehmend positiv-kontraktilen ET-Effekt an SHR-Myozyten, was dieses Argument unterstützt. Hinzu kommt, dass in SHR-Kardiomyozyten durch ein aktiviertes ET-System möglicherweise insgesamt höhere ET-Konzentrationen auftreten, so dass ein weiterer direkter ET-Effekt auf die lastfreie Zellverkürzung nicht mehr erwartet werden kann. Zusammenfassend kann also postuliert werden, dass ET in niedrigen Konzentrationen einen Effekt in der lastfreien Zellverkürzung zeigen kann, der aber eventuell aufgrund der hier verwendeten, relativ hohen Konzentrationen nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Auch bei der Untersuchung einer möglichen weiteren Hypertrophie der SHR-Kardiomyozyten nach 24 Stunden ET-Inkubation zeigte sich kein signifikanter Effekt von ET oder ET/PD142893-Coinkubation auf die Zellgrößenparameter mehr (Abb. 5.3). Hierfür scheinen die schon basal vorliegende Hypertrophie oder erneut eine modifizierte Rezeptorenkopplung die naheliegenden Erklärungen zu sein (s.u.). Zwei weitere Studien, die jedoch *in vivo*, mit anderen ERAs und über mehrere Wochen durchgeführt wurden, konnten hingegen durchaus einen möglichen Effekt einer Rezeptorenblockung auf die ET-vermittelte Hypertrophie zeigen. Die Arbeitsgruppe von Karam et al. konnte in SHR-Ratten durch eine zehnwöchige Einnahme von Bosentan eine linksventrikuläre Hypertrophie signifikant um sieben Prozent senken [188]. Ito et al. zeigten in einem Hypertensionsmodell mittels sogenannten „aortic banding“ an Ratten, dass eine ET_A-Blockung - innerhalb der einwöchigen Untersuchungszeit - die Zunahme einer sich entwickelnden Hypertrophie verhindern konnte [190].

Die fehlenden Veränderungen in der lastfreien Zellverkürzung gingen – wie erwartet - auch mit fehlenden Modifikationen des Phosphorylierungsgrads der MAP-Kinasen p38 und JNK einher (Abb. 4.5.4). Eine in SHR-Kardiomyozyten beschriebene ET-Rezeptor-Downregulation könnte eine Erklärung für diese Ergebnisse sein [191]. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass, ähnlich zur idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie, bei einem heraufreguliertem kardialen ET-System ein Verlust der ET-Rezeptorenkopplung vorliegt [125].

Die p42/p44-MAP-Kinasen zeigten unter ET-Einfluss ohne PD-Vorinkubation einen signifikanten Effekt, mit PD-Vorinkubation jedoch nur einen Trend hin zur vermehrten Phosphorylierung (Abb. 4.5.4). Dieses ist identisch mit dem Bild, welches sich unter normotensiven-normoglykämischen Bedingungen zeigt. Dies weist also darauf hin, dass in Kardiomyozyten von SHR-Tieren die p42/p44-MAPK-Rezeptorenkopplung zwar intakt ist, der abhängige Prozess der (weiteren) Prohypertrophie jedoch verloren geht. Diese Veränderung der ET_B-Ansprechbarkeit während Entwicklung und Fortschreiten einer Hypertrophie in SHR-Tieren konnte auch schon in anderen Studien gezeigt werden [76].

Die vorliegende Studie zeigt also, dass in Kardiomyozyten von SHR-Tieren zwar eine p42/p44 MAPK-Phosphorylierung stattfindet, der abhängige Prozess der Hypertrophie-Beeinflussung jedoch verloren geht. Der für die kontraktile Ansprechbarkeit verantwortliche Signalweg wird hingegen schon auf Ebene der p38-MAPK und JNK-Phosphorylierung modifiziert. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Rezeptorenkopplung der Kardiomyozyten von SHR-Tieren modifiziert bzw. beeinträchtigt wird, aber nicht vollständig verloren geht.

5.6 Endothelin und PD142893 zeigen unter Hyperglykämie unter anderem aufgrund modifizierter Rezeptorenkopplung Effekte in der lastfreien Zellverkürzung, jedoch nicht bei den Zellgrößenparametern

Eine Hyperglykämie veränderte gegenüber normoglykämischen Bedingungen die kontraktile Ansprechbarkeit weder akut noch nach 24 Stunden Inkubation (Abb. 4.4.1). Im Gegensatz hierzu fanden Lieu & Reid schon 1994 den Einfluss von Streptozocin-induziertem Diabetes auf die kardiale ET-Ansprechbarkeit in Ratten-Kardiomyozyten der Atria [192]: Nach zwei und vier Wochen diabetischen Bedingungen *in vivo* konnten sie einen positiv-inotropen *in-vitro*-ET-Effekt nachweisen, der jedoch nach acht und zwölf Wochen wieder abnahm. Hileeto et al. zeigten einen signifikanten LVEF-Anstieg in der Echokardiographie sechs Monate nach Diabetesinduktion [193].

Mit anderen Studien übereinstimmend war die Hypertrophie für Myozyten, welche unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden. Zwar ist dieser prohypertrophe Effekt einer Hyperglykämie schon längere Zeit aus unterschiedlichen Modellen bekannt [161, 182, 194], interessant ist jedoch insbesondere der schnelle zeitliche Verlauf im vorliegenden Versuchsaufbau. So konnte hier gezeigt werden, dass sich schon nach 24 Stunden Inkubation eine signifikante Zellgrößenzunahme entwickelte. Bei identischer Glukosekonzentration zeigten Chen et al. erst nach 48 Stunden Inkubation eine sich entwickelnde Hypertrophie [182]. Diese Untersuchungen fanden allerdings mit primären Zellkulturen an nicht-stäbchenförmigen, neonatalen Kardiomyozyten statt, die aufgrund ihrer Sternform keinen Unterschied in der Aussage über die Form der Hypertrophie (Zellbreite vs. –länge) zuließen. Nunoda et al. untersuchten hingegen humane Myokardbiopsien, Shehadeh & Regan beziehen sich in ihrem Übersichtsartikel auf Ergebnisse der Framingham-Studie und verweisen dabei auf Echokardiographie-Befunde am Menschen [161, 194].

Im Akutexperiment im hyperglykämischen Medium steigerte ET wie unter Normoglykämie zwar die Zellverkürzung – dieses Mal jedoch über einen PD142893-resistenten Weg. Dies zeigt, dass eine Hyperglykämie vermutlich mit der ET_{B2}-Rezeptorenkopplung interagiert und ET eventuell über diesen nun eine positive kontraktile Ansprechbarkeit vermitteln kann. Eine vorausgegangene Studie konnte bereits zeigen, dass eine Hyperglykämie in Rattenkardiomyozyten zu einer Hochregulierung von ET, ET_A und ET_B auf verschiedenen Ebenen (mRNA, Immunhistochemie, autoradiographische Bindungsuntersuchungen) führt und Bosentan nur in der Lage ist, die Steigerung der ET_A-Expression sowie der ET-Bindung zu unterdrücken [160]. Im Gegensatz hierzu zeigte eine weitere Arbeitsgruppe in ihren Ergebnissen eine Hochregulierung von ET_A- und eine Herabregulierung von ET_B-Rezeptoren in Diabetes an Rattenherzen [195]. Trotz somit gezeigter verringerter ET-Rezeptorenbindung wie auch herabregulierten ET_B-Rezeptoren unter Hyperglykämie scheint der ET_{B2}-Rezeptoren eine zu physiologischen Bedingungen modifizierte Rolle in der kontraktile Ansprechbarkeit zu spielen.

Auch bei chronischer Inkubation zeigte ET einen - entgegen der Normoglykämie - signifikant positiven Effekt auf die lastfreie Zellverkürzung. Unter PD142893-Coinkubation zeigten sich keine Abweichungen in der lastfreien Zellverkürzung im Vergleich zur Kontrolle mehr. Dies kann nun durch zwei Theorien erklärt werden. Entweder konnte der positiv-kontraktile ET-Effekt also durch den ERA geblockt werden und/oder es zeigte sich wie unter normoglykämischer Langzeitinkubation (Abschnitt 5.3) erneut eine ET_{B2}-vermittelte Verschiebung der Werte in Richtung negative kontraktile Ansprechbarkeit. Da jedoch keine JNK-Aktivierung stattfand (s.u.) scheint Letzteres eher unwahrscheinlich. ET verursachte also am Wahrscheinlichsten, wie auch unter normoglykämischen Bedingungen unter JNK-Inhibition, einen positiv-kontraktilen Effekt *unabhängig* von ET_{B2}-Rezeptoren. An der schon weiter oben erwähnten Studie von Hileeto et al. war hierzu auch interessant, dass eine Behandlung mit Bosentan bei den diabetischen Tieren dazu führte, dass der Diabetes-induzierte LVEF-Anstieg komplett verhindert werden konnte [193]. Aufgrund des hier gewählten Studiendesigns mit Zugabe von PD142893 erst nach 24 Stunden Hyperglykämie sind die Studien jedoch nur bedingt vergleichbar.

Weder ET noch PD142893 waren dazu in der Lage, auf die unter Hyperglykämie basal hypertrophierten Zellen einen weiteren Einfluss zu nehmen (Abb. 4.6.3). Chen et. al. konnten 2007 hingegen zeigen, dass eine glukoseinduzierte Hypertrophie bei frühzeitiger Coinkubation durch den unspezifische ERA Bosentan verhindert werden kann [182]. Auch andere Studien zeigten ET-abhängige kardiale Veränderungen in Streptozocin-induzierten *in vivo* Diabetes-Modellen, dies jedoch über Zeiträume von

mehrere Wochen [160, 196]. Um zu untersuchen, ob eine Glukose-induzierte Hypertrophie zu verhindern gewesen wäre, hätte eine PD142893-Inkubation gleichzeitig zum hyperglykämischen Stimulus stattfinden müssen. Aufgrund des in dieser Studie gewählten Versuchsaufbaus (s.o.) konnte der von Chen et al. gefundene, interessante Bosentan-Effekt somit nicht mit dem hier verwendeten ERA PD142893 verglichen werden.

Die Veränderungen in der lastfreien Zellverkürzung gingen dieses Mal ohne signifikante Modifikationen des Phosphorylierungsgrads der MAP-Kinasen p38 und JNK einher (Abb. 4.6.4) – fanden also über einen p38/JNK-unabhängigen Signalweg statt.

Die die Zellhypertrophie beeinflussenden p42/p44-MAP-Kinasen hingegen zeigten unter ET-Einfluss sowohl ohne als auch mit PD-Vorinkubation eine signifikant stärkere Phosphorylierung (Abb. 4.6.4). Ähnlich zu SHR-Kardiomyozyten weist die vorliegende Studie also darauf hin, dass in Kardiomyozyten unter Hyperglykämie die p42/p44 MAPK-Rezeptorenkopplung zwar intakt ist, der abhängige Prozess der (weiteren) Hypertrophie jedoch auch hier verloren geht. Chen 2007 et al. hingegen zeigten in Kardiomyozyten unter Hyperglykämie eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung der p42/44 MAP-Kinase [182]. Eine simultane Inkubation mit Bosentan verhinderte diese MAP-Kinasenaktivierung. Eine Inhibierung der upstream gelegenen PKC resultierte in einer vollständigen Normalisierung der Glukose-induzierten MAPK-Aktivierung.

Ergänzend soll erwähnt werden, dass eine Hyperglykämie allein zu einer gesteigerten Diacylglycerol (DAG)-vermittelten PKC-Aktivierung und so aufgrund der überlappenden Signalkaskaden insgesamt zu veränderten ET-Effekten führen kann [25, 197–199].

Dies zeigt also, dass ET- und PD-abhängige Veränderungen in der kontraktilen Ansprechbarkeit und den Zellgrößenparameter unter hyperglykämischen Bedingungen deutlich von denen unter physiologischen Bedingungen modifiziert sind. Gleiches gilt für die p42/p44 MAPK-Phosphorylierung, deren abhängiger Prozess der Hypertrophie-Beeinflussung verloren geht. Der für die kontraktile Ansprechbarkeit verantwortliche Signalweg wird hingegen erneut schon auf Ebene der p38-MAPK und JNK-Phosphorylierung modifiziert. Zusammengefasst bedeutet dies, dass auch hier die Rezeptorenkopplung der Kardiomyozyten unter Hyperglykämie modifiziert bzw. beeinträchtigt wird, aber nicht vollständig verloren geht.

6 Zusammenfassung

Die (chronische) Herzinsuffizienz stellt insbesondere in einer alternden Gesellschaft einen zunehmenden sozioökonomischen Faktor dar. Die zunächst hilfreichen, körpereigenen Kompensationsmechanismen enden jedoch in einem Circulus vitiosus und werden u.a. durch das Endothelin (ET)-System beeinflusst. Bisherige Versuche einer Herzinsuffizienz-Therapie mit ET-Rezeptorantagonisten (ERAs) konnten sich allerdings nicht bewähren. Ein Grund hierfür könnte die bisherige, gleichzeitige Modulierung mehrerer ET-Rezeptoruntergruppen sein. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, wie der spezifische ET_{A/B1}-Rezeptorantagonist PD142893 unter ET-Stimulation in Teilaspekte der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eingreift. Außerdem sollte gezeigt werden, ob kardialen Stressbedingungen wie Hyperglykämie und chronische Hypertension eine weitere Modulation bewirken.

Für die Untersuchungen wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen normotensiver oder chronisch hypertensiver adulter Ratten isoliert. Diese inkubierten über 1, 6 und 24 Stunden mit ET ± PD142893, ggf. zusätzlich unter hyperglykämischen Bedingungen (30 mM Glukose). Es erfolgte die Messung der kontraktilen Ansprechbarkeit im elektrischen Feld, die Bestimmung des Zellquerschnitts als Hypertrophiemarker, sowie die Bestimmung möglicher MAP-Kinasenaktivierungen durch Analyse der Phosphorylierungen von p38, JNK und p42/44.

ET bewirkte einen zeitabhängigen, kardiodepressiven Effekt über eine ET_{B2}-Rezeptor-abhängige Aktivierung des JNK-Signalwegs. Außerdem zeigte ET einen prohypertrophen Effekt via einer ET_A/ET_{B1}-Rezeptor-abhängigen Aktivierung des p42/44-Signalwegs und bewirkte über ET_{B2} auch negativ hypertrophe Effekte. Modelle der chronischen Hypertension wie auch der Hyperglykämie zeigten unter anderem aufgrund modifizierter Rezeptorenkopplungen differenzierte Effekte in der lastfreien Zellverkürzung und den Zellgrößenparametern.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei der Entwicklung möglicher Ansatzpunkte einer künftigen Herzinsuffizienztherapie mit ERAs ein besonderes Augenmerk auf die selektive Intervention der einzelnen Rezeptorsubgruppen gelegt werden sollte. Die gezeigten Rezeptormodulationen durch die häufig koinzidenten pathophysiologischen Zustände Hyperglykämie und Hypertension erschweren eindeutige Vorhersagen der Wirkung eines Eingriffes in das ET-System.

7 Summary

Chronic heart failure represents an increasing socio-economic factor particularly in ageing society. The initially helpful, natural compensatory mechanisms of the organism, however, end in a vicious circle and are affected by the Endothelin (ET) system. Previous efforts of heart failure therapy using endothelin receptor antagonists (ERAs) could not stand the test. One reason for this might have been that multiple ET receptor subgroups were regulated simultaneously. In this study we investigated how the specific ET_{A/B1}-receptor antagonist PD142893 intervenes in partial aspects of heart failure during endothelin stimulation. Furthermore a possible modulation in conditions of cardiac stress such as hyperglycaemia and chronic hypertension was investigated.

The study was performed in ventricular cardiomyocytes isolated from normotensive or hypertensive rat. These were incubated with ET ± PD142893 under normoglycaemic (5 mM glucose) or hyperglycaemic conditions (30 mM glucose) for 1, 6 and 24 h. Load free cell shortening was monitored as a read-out of cell function, cell sizes were analyzed as a parameter of hypertrophy and activation of MAP kinase pathways was determined by p42/p44, p38, and JNK phosphorylation.

ET caused a time-dependent, cardiodepressive effect via an ET_{B2}-receptor-dependent activation of the JNK-pathway. Additionally ET showed pro-hypertrophic effects via an ET_A/ET_{B1}-receptor-dependent activation of the p42/44-pathway and caused a negative hypertrophy via ET_{B2}. Models of chronic hypertension and hyperglycaemia showed differentiated effects in load free cell shortening and cell sizes caused by altered receptor coupling.

The present paper shows that in the development of possible prospective therapies in heart failure with ERAs we should focus on selective intervention of distinct ET receptor subgroups. The shown receptor modulations by often coincidentally present pathophysiologic conditions such as hyperglycaemia and chronic hypertension complicate precise prognoses concerning the impact of interventions in the ET system.

8 Abkürzungsverzeichnis

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
Aqua bidest	aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
ARVCM	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
ESC	European Society of Cardiology
ERA	Endothelin-Rezeptorantagonist
ET	Endothelin
FCS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
HF-REF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
HF-PEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	mol/l
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. „phosphate buffered saline“)
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Aktivität
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. „revolutions per minute“)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SHR	Spontan Hypertensive Ratte
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
TBS	Tris-buffered saline (Puffer)
ZVD	Zentraler Venendruck

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1.1: Formel zur Berechnung der linksventrikulären Ejektionsfraktion
- Abbildung 1.2.1: Aminosäuresequenzen der drei ET-Isoformen sowie des Venoms Sarafatoxin S6b
- Abbildung 3.2.1: System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellverkürzung
- Abbildung 3.2.2: Ausrichtung der Zeilenkamera
- Abbildung 3.2.3: Aufbau der Versuchsvorrichtung aus Zeilenkamera, Bedienfeld und Oszillator
- Abbildung 3.2.4: Beispielhafte Abbildung des Oszillatorinterfaces mit Einstellung der Zellgrenzen
- Abbildung 3.3.1: Oben: Schema der Funktionsweise des Rapid Step™ ECL Chemilumineszenz-Reagens mit durch Erst- und Zweitantikörper gebundenem Antigen (=gesuchtes Protein). Unten: ablaufende Reaktion aus Reagens und HRP zu Licht
- Abbildung 4.1.1: Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die lastfreie Zellverkürzung, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)
- Abbildung 4.1.2: Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p38 und JNK nach einer Stunde Inkubation mit ET (1 µM), jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)
- Abbildung 4.2.1: Zeit-Wirkungsbeziehung von ET (1 µM) auf die lastfreie Zellverkürzung
- Abbildung 4.2.2: Zeit-Wirkungsbeziehung von ET (1 µM) auf die lastfreie Zellverkürzung nach Vorinkubation mit PD142893 (100 nM).
- Abbildung 4.3.1: Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen nach 24 Stunden Inkubation, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)
- Abbildung 4.3.2: Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p42/44 nach einer Stunde Inkubation mit ET (1 µM), jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)
- Abbildung 4.4.1: Darstellung der lastfreien Zellverkürzung unter physiologischen Bedingungen (Wistar NG) im Vergleich zu chronischer Hypertension (SHR) und Hyperglykämie (Wistar HG). Ergebnisse nach einer und 24 Stunden Inkubation
- Abbildung 4.4.2: Darstellung der Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen unter physiologischen Bedingungen (Wistar NG) im Vergleich zu chronischer Hypertension (SHR) und Hyperglykämie (Wistar HG) nach 24 Stunden Inkubation
- Abbildung 4.5.1: Akuteffekt (Inkubation eine Stunde) von ET (1 µM) auf die lastfreie Zellverkürzung von SHR-Kardiomyozyten, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)

- Abbildung 4.5.2: Chronischer Effekt (Inkubation 24 Stunden) von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung von SHR-Kardiomyozyten. Jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)
- Abbildung 4.5.3: Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen von SHR-Kardiomyozyten nach 24 Stunden Inkubation, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)
- Abbildung 4.5.4: Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p38, JNK und p42/44 von SHR-Kardiomyozyten nach 1 Stunde Inkubation mit ET (1 μ M), jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893 (100 nM)
- Abbildung 4.6.1: Akuteffekt (Inkubation 1 Stunde) von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893
- Abbildung 4.6.2: Chronischer Effekt (Inkubation 24 Stunden) von ET (1 μ M) auf die lastfreie Zellverkürzung unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893
- Abbildung 4.6.3: Konzentrations-Wirkungsbeziehung steigender ET-Konzentrationen auf die Zellgrößenparameter Zellbreite, -länge und -volumen nach 24 Stunden Inkubation unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils ohne und mit Vorinkubation mit PD142893
- Abbildung 4.6.4: Darstellung des Phosphorylierungsgrades der MAP-Kinasen p38, JNK und p42/44 nach einer Stunde Inkubation unter hyperglykämischen Bedingungen, jeweils mit und ohne Vorinkubation mit PD142893

9.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1.1.1: Framingham-Kriterien
- Tabelle 1.1.2: Funktionelle Klassifikation der Herzinsuffizienz basierend auf dem Schweregrad der Symptome und physischer Aktivität nach der New York Heart Association
- Tabelle 1.2.1: Auswahl von vasoaktiven Substanzen

10 Literaturverzeichnis

1. McMurray JJ V, Adamopoulos S, Anker SD, et al (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur Heart J* 33:1787–847
2. Rihal CS, Davis KB, Kennedy JW, Gersh BJ (1995) The utility of clinical, electrocardiographic, and roentgenographic variables in the prediction of left ventricular function. *Am J Cardiol* 75:220–3
3. Hasenfuss G, Anker SD, Bauersachs J, Böhm M, Hoppe U, Pieske B, von Scheidt W, Wachter R, Nowak B (2012) Pocket-Leitlinie: Herzinsuffizienz Update 2012.
4. Dolgin M (1994) Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of heart and Great Vessels. 9th ed. Bost. Mass Little, Brown Co. pp 253–256
5. Herold G (2008) NYHA-Stadien der New York Heart Association. In: Gerd Herold und Mitarbeiter (ed) *Inn. Medizin Herold*. pp 190–191
6. Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005) [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94:488–509
7. Hogg K, Swedberg K, McMurray J (2004) Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 43:317–27
8. Dokainish H, Nguyen JS, Bobek J, Goswami R, Lakkis NM (2011) Assessment of the American Society of Echocardiography-European Association of Echocardiography guidelines for diastolic function in patients with depressed ejection fraction: an echocardiographic and invasive haemodynamic study. *Eur J Echocardiogr* 12:857–64
9. Kirkpatrick JN, Vannan MA, Narula J, Lang RM (2007) Echocardiography in heart failure: applications, utility, and new horizons. *J Am Coll Cardiol* 50:381–96
10. Nagueh SF, Bhatt R, Vivo RP, Krim SR, Sarvari SI, Russell K, Edvardsen T, Smiseth OA, Estep JD (2011) Echocardiographic evaluation of hemodynamics in patients with decompensated systolic heart failure. *Circ Cardiovasc Imaging* 4:220–7
11. McMurray JJ, Stewart S (2000) Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83:596–602
12. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ (2003) Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 289:194–202

13. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22:6A–13A
14. Mosterd A, Hoes AW (2007) Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93:1137–46
15. Kannel WB (2000) Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 5:167–73
16. Statistisches Bundesamt (2012) Die 20 häufigsten Hauptdiagnosen der vollstationär behandelten männlichen Patienten (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) nach der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) 2012. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Kranke/nhaeuser/Tabellen/DiagnosenMaennlich.html>.
17. Herold G (2008) Kompensationsmechanismen bei Herzinsuffizienz. In: Gerd Herold und Mitarbeiter (ed) *Inn. Medizin Herold*. pp 188–189
18. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248:C550–6
19. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411–5
20. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isoforms predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2863–7
21. Giannessi D, Del Ry S, Vitale RL (2001) The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 43:111–26
22. Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM (2001) Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res* 2:90–101
23. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988) Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 255:H970–3
24. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988) Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch* 413:108–10
25. Rubanyi GM, Polokoff MA (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46:325–415
26. Malek AM, Zhang J, Jiang J, Alper SL, Izumo S (1999) Endothelin-1 gene suppression by shear stress: pharmacological evaluation of the role of tyrosine kinase, intracellular calcium, cytoskeleton, and mechanosensitive channels. *J Mol Cell Cardiol* 31:387–99

27. Bodi I, Bishopric NH, Discher DJ, Wu X, Webster KA (1995) Cell-specificity and signaling pathway of endothelin-1 gene regulation by hypoxia. *Cardiovasc Res* 30:975–84
28. Rodeheffer R, Miller W, Burnett JJ (1996) Pathophysiology of circulatory failure. In: Guilani E, Gersh B, Megoon M, D H, Schaff H (eds) *Mayo Clin. Pract. Clin. Cardiol.* Mosby, pp 550–68
29. Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K (1992) Endothelin-converting enzymes. *FASEB J* 6:2653–9
30. Matsumura Y, Ikegawa R, Tsukahara Y, Takaoka M, Morimoto S (1990) Conversion of big endothelin-1 to endothelin-1 by two types of metalloproteinases derived from porcine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 272:166–70
31. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, DeWit D, Yanagisawa M (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78:473–85
32. Emoto N, Yanagisawa M (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270:15262–8
33. Mockridge JW, Kuc RE, Huskisson NS, Barker PJ, Davenport AP (1998) Characterization of site-directed antisera against endothelin-converting enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1:S35–7
34. Seneri GG, Cecioni I, Vanni S, et al (2000) Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy: endothelin-1 system in the human failing heart. *Circ Res* 86:377–85
35. Nunez DJ, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wyse RK (1990) Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest* 85:1537–41
36. Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y (1993) Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 191:823–30
37. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M (1995) Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* 96:1059–65
38. Levin ER (1995) Endothelins. *N Engl J Med* 333:356–63
39. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, Sugita Y, Yoshizawa T, Uchiyama Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Kanazawa I (1989) Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164:587–93

40. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M (1989) Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164:74–80
41. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348:730–2
42. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348:732–5
43. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268:19126–33
44. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi-Arai, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H (1991) Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 287:23–6
45. Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR (1989) Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5:S85–8; discussion S102
46. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9797–800
47. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ (1995) Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 92:357–63
48. Davenport AP, Maguire JJ (1994) Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ETA receptors in humans? *Trends Pharmacol Sci* 15:9–11
49. Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C, Gresham GA, Davenport AP (1993) Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 72:526–38
50. Modesti PA, Vanni S, Paniccia R, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Sani G, Neri Serneri GG (1999) Characterization of endothelin-1 receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:333–9
51. Allen BG, Phuong LL, Farhat H, Chevalier D (2003) Both endothelin-A and endothelin-B receptors are present on adult rat cardiac ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 81:95–104
52. Masaki T (1998) The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res* 39:530–3
53. Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M (2002) Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol* 22:207–26

54. Gregan B, Jürgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A (2004) Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 279:27679–87
55. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, Nakagawa K, Hamada T, Otani S, Yanagisawa M, Takeda T (1991) Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Intern Med* 114:213–5
56. Hirai Y, Adachi H, Fujiura Y, Hiratsuka A, Enomoto M, Imaizumi T (2004) Plasma endothelin-1 level is related to renal function and smoking status but not to blood pressure: an epidemiological study. *J Hypertens* 22:713–8
57. Clozel M, Breu V, Burri K, Cassal JM, Fischli W, Gray GA, Hirth G, Löffler BM, Müller M, Neidhart W (1993) Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 365:759–61
58. Li JS, Schiffrin EL (1995) Effect of chronic treatment of adult spontaneously hypertensive rats with an endothelin receptor antagonist. *Hypertension* 25:495–500
59. Miyagawa K, Emoto N (2014) Current state of endothelin receptor antagonism in hypertension and pulmonary hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 8:202–16
60. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V (1998) The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 338:784–90
61. Nakov R, Pfarr E, Eberle S (2002) Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 15:583–9
62. Mann JFE, Green D, Jamerson K, Ruilope LM, Kuranoff SJ, Littke T, Viberti G (2010) Avasentan for overt diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21:527–35
63. Widyanoro B, Emoto N, Nakayama K, et al (2010) Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation* 121:2407–18
64. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D (1991) Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 114:464–9
65. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328:1732–9
66. Galiè N, Corris PA, Frost A, et al (2013) Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62:D60–72
67. Barst RJ, Langleben D, Frost A, et al (2004) Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 169:441–7

68. Lavelle A, Sugrue R, Lawler G, Mulligan N, Kelleher B, Murphy DM, Gaine SP (2009) Sitaxentan-induced hepatic failure in two patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 34:770–1
69. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, et al (2013) Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 369:809–18
70. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, et al (2011) Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 70:32–8
71. Hingorani VJ, Major T, Panek R, Flynn M, Reynolds E, He X, Cody W, Doherty A, Rapundalo S (1992) In vitro pharmacology of a non-selective (ETA/ETB) endothelin receptor antagonist, PD142893. *FASEB J*.
72. Cody WL, Doherty AM, He JX, DePue PL, Rapundalo ST, Hingorani GA, Major TC, Panek RL, Dudley DT, Haleen SJ (1992) Design of a functional hexapeptide antagonist of endothelin. *J Med Chem* 35:3301–3
73. Sudjarwo SA, Hori M, Tanaka T, Matsuda Y, Okada T, Karaki H (1994) Subtypes of endothelin ETA and ETB receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 200:627–33
74. Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR (1993) Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br J Pharmacol* 110:777–82
75. Mizuguchi T, Nishiyama M, Moroi K, Tanaka H, Saito T, Masuda Y, Masaki T, de Wit D, Yanagisawa M, Kimura S (1997) Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br J Pharmacol* 120:1427–30
76. Lee GR, Bell D, Kelso EJ, Argent CCH, McDermott BJ (2004) Evidence for altered ETB receptor characteristics during development and progression of ventricular cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H425–32
77. Battistini B, D'Orléans-Juste P, Sirois P (1993) Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 68:600–28
78. Kedzierski RM, Yanagisawa M (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:851–76
79. Clerico A, Del Chicca MG, Zucchelli GC, Biver P, Mariani G, Bertelli A, Bertelli AA (1994) Critical evaluation of endothelins assay. *Int J Tissue React* 16:79–87
80. Shaw SG, Schmid M, Casty A (2000) Critical factors in the radioimmunoassay of endothelin-1, endothelin-3, and big endothelin-1 in human plasma. *Anal Biochem* 278:143–9

81. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F (1991) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest* 87:1867–71
82. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhäusl W, Binder BR (1992) Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 267:16066–8
83. Snabaitis AK, Muntendorf A, Wieland T, Avkiran M (2005) Regulation of the extracellular signal-regulated kinase pathway in adult myocardium: differential roles of G(q/11), Gi and G(12/13) proteins in signalling by alpha1-adrenergic, endothelin-1 and thrombin-sensitive protease-activated receptors. *Cell Signal* 17:655–64
84. Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F (1993) Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology* 132:524–9
85. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271:3221–8
86. Wu DQ, Lee CH, Rhee SG, Simon MI (1992) Activation of phospholipase C by the alpha subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. *J Biol Chem* 267:1811–7
87. Clerk A, Sugden PH (1997) Regulation of phospholipases C and D in rat ventricular myocytes: stimulation by endothelin-1, bradykinin and phenylephrine. *J Mol Cell Cardiol* 29:1593–604
88. Simonson MS, Dunn MJ (1990) Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 4:2989–3000
89. Nishimura J, Moreland S, Ahn HY, Kawase T, Moreland RS, van Breemen C (1992) Endothelin increases myofilament Ca²⁺ sensitivity in alpha-toxin-permeabilized rabbit mesenteric artery. *Circ Res* 71:951–9
90. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH (1993) Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett* 317:271–5
91. Koide M, Kawahara Y, Tsuda T, Ishida Y, Shii K, Yokoyama M (1992) Endothelin-1 stimulates tyrosine phosphorylation and the activities of two mitogen-activated protein kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 10:1173–82
92. Qiagen Endothelin-1 Signaling Pathway.
http://www.qiagen.com/de/products/genes_and_pathways/pathway_details?pwid=150. Accessed 22 Mar 2015
93. Drawnel FM, Archer CR, Roderick HL (2013) The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth. *Br J Pharmacol* 168:296–317

94. Eguchi S, Hirata Y, Marumo F (1993) Endothelin subtype B receptors are coupled to adenylate cyclase via inhibitory G protein in cultured bovine endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8:S161–3
95. De Giusti VC, Correa M V, Villa-Abrille MC, Beltrano C, Yeves AM, de Cingolani GEC, Cingolani HE, Aiello EA (2008) The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sci* 83:264–71
96. Sirviö ML, Metsärinne K, Saijonmaa O, Fyhrquist F (1990) Tissue distribution and half-life of ¹²⁵I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem Biophys Res Commun* 167:1191–5
97. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhäusl W (1990) Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 81:1415–8
98. Hilal-Dandan R, Villegas S, Gonzalez A, Brunton LL (1997) The quasi-irreversible nature of endothelin binding and G protein-linked signaling in cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 281:267–73
99. Chun M, Lin HY, Henis YI, Lodish HF (1995) Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *J Biol Chem* 270:10855–60
100. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11728–32
101. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M (1994) Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1461–5
102. Kelland NF, Kuc RE, McLean DL, et al (2010) Endothelial cell-specific ETB receptor knockout: autoradiographic and histological characterisation and crucial role in the clearance of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 88:644–51
103. Brunner F, Doherty AM (1996) Role of ET(B) receptors in local clearance of endothelin-1 in rat heart: studies with the antagonists PD 155080 and BQ-788. *FEBS Lett* 396:238–42
104. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G (1996) Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 94:1578–84
105. Abassi ZA, Golomb E, Bridenbaugh R, Keiser HR (1993) Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase EC.3.4.24.11. *Br J Pharmacol* 109:1024–8
106. Attinà T, Camidge R, Newby DE, Webb DJ (2005) Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart* 91:825–31
107. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, Maemura K, Nagai R, Ishikawa T, Yazaki Y (1995) Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest* 96:293–300

108. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S i, Clouthier DE, Yanagisawa M (2000) Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest* 105:1373–82
109. Zhao X-S, Pan W, Bekeredjian R, Shohet R V (2006) Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation* 114:830–7
110. Medvedeva NA, Sheffer R, Medvedev OS (1992) Two-phase effect of endothelin-1 on resistance of coronary vessels in anesthetized rats with intact chest. *Biull Eksp Biol Med* 114:257–60
111. Wang QD, Gonon A, Shimizu M, Sjöquist PO, Pernow J (1998) Contribution of endothelin to the coronary vasoconstriction in the isolated rat heart induced by nitric oxide synthase inhibition. *Acta Physiol Scand* 163:325–30
112. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkelä R, Ilves M, Mäkinen M, Orzechowski H-D, Paul M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H (2006) Inverse regulation of preproendothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1beta genes in cardiac cells by mechanical load. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1639–45
113. Chua BH, Chua CC, Diglio CA, Siu BB (1993) Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1178:201–6
114. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75:977–84
115. Cingolani HE, Ennis IL, Aiello EA, Pérez NG (2011) Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain. *Pflugers Arch* 462:29–38
116. Hu JR, Von Harsdorf R, Lang RE (1988) Endothelin has potent inotropic effects in rat atria. *Eur J Pharmacol* 158:275–8
117. Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH (1989) Inotropic effects of endothelin in ferret ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 163:365–7
118. Takanashi M, Endoh M (1991) Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am J Physiol* 261:H611–9
119. Fraticelli A, Rossi L, Socillo AI, Boria C, Capogrossi MC, Paciaroni E (1992) Endothelin-1 may act as a negative inotropic agent in cardiac myocytes from young and senescent rats. *Arch Gerontol Geriatr* 15 Suppl 1:151–8
120. Ono K, Tsujimoto G, Sakamoto A, Eto K, Masaki T, Ozaki Y, Satake M (1994) Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents. *Nature* 370:301–4
121. Izumi M, Miyamoto S, Hori M, Ozaki H, Karaki H (2000) Negative inotropic effect of endothelin-1 in the mouse right ventricle. *Eur J Pharmacol* 396:109–17
122. Namekata I, Fujiki S, Kawakami Y, Moriwaki R, Takeda K, Kawanishi T, Takahara A, Shigenobu K, Tanaka H (2008) Intracellular mechanisms and

- receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376:385–95
123. Thomas GP, Sims SM, Karmazyn M (1997) Differential effects of endothelin-1 on basal and isoprenaline-enhanced Ca^{2+} current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 503 (Pt 1):55–65
124. Baltogiannis GG, Tsalikakis DG, Mitsi AC, Hatzistergos KE, Elaiopoulos D, Fotiadis DI, Kyriakides ZS, Kolettis TM (2005) Endothelin receptor--a blockade decreases ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 67:647–54
125. Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G (1999) Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 99:1802–9
126. Bootman MD, Harzheim D, Smyrniak I, Conway SJ, Roderick HL (2007) Temporal changes in atrial EC-coupling during prolonged stimulation with endothelin-1. *Cell Calcium* 42:489–501
127. Kockskämper J, Seidlmayer L, Walther S, Hellenkamp K, Maier LS, Pieske B (2008) Endothelin-1 enhances nuclear Ca^{2+} transients in atrial myocytes through $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -dependent Ca^{2+} release from perinuclear Ca^{2+} stores. *J Cell Sci* 121:186–95
128. Yang HT, Sakurai K, Sugawara H, Watanabe T, Norota I, Endoh M (1999) Role of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in endothelin-1-induced increases in Ca^{2+} transient and contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. *Br J Pharmacol* 126:1785–95
129. Westfall M V, Lee AM, Robinson DA (2005) Differential contribution of troponin I phosphorylation sites to the endothelin-modulated contractile response. *J Biol Chem* 280:41324–31
130. Cuello F, Bardswell SC, Haworth RS, Yin X, Lutz S, Wieland T, Mayr M, Kentish JC, Avkiran M (2007) Protein kinase D selectively targets cardiac troponin I and regulates myofilament Ca^{2+} sensitivity in ventricular myocytes. *Circ Res* 100:664–73
131. Parris RJ, Webb DJ (1997) The endothelin system in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Vasc Med* 2:31–43
132. Haynes WG, Ferro CJ, O’Kane KP, Somerville D, Lomax CC, Webb DJ (1996) Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 93:1860–70
133. Yorikane R, Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Sugishita Y, Goto K (1993) Increased production of endothelin-1 in the hypertrophied rat heart due to pressure overload. *FEBS Lett* 332:31–4
134. Mayyas F, Niebauer M, Zurick A, Barnard J, Gillinov AM, Chung MK, Van Wagoner DR (2010) Association of left atrial endothelin-1 with atrial rhythm, size,

- p and fibrosis in patients with structural heart disease.
- Circ Arrhythm Electrophysiol*
- 3:369–79
135. Hiroe M, Hirata Y, Fujita N, Umezawa S, Ito H, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Takamoto T, Marumo F (1991) Plasma endothelin-1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 68:1114–5
 136. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ (1992) Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 85:1374–9
 137. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R (1992) Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 85:504–9
 138. Rodeheffer RJ, Lerman A, Heublein DM, Burnett JC (1992) Increased plasma concentrations of endothelin in congestive heart failure in humans. *Mayo Clin Proc* 67:719–24
 139. Motte S, van Beneden R, Mottet J, et al (2003) Early activation of cardiac and renal endothelin systems in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2482–91
 140. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC (1994) Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 89:1580–6
 141. Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1999) Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. *Am J Physiol* 276:H1197–206
 142. Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T (1995) Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 268:H2084–91
 143. Yamauchi-Kohno R, Miyauchi T, Hoshino T, Kobayashi T, Aihara H, Sakai S, Yabana H, Goto K, Sugishita Y, Murata S (1999) Role of endothelin in deterioration of heart failure due to cardiomyopathy in hamsters: increase in endothelin-1 production in the heart and beneficial effect of endothelin-A receptor antagonist on survival and cardiac function. *Circulation* 99:2171–6
 144. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1996) Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation* 93:1214–22
 145. Ergul A, Grubbs AL, Zhang Y, Spinale FG (2000) Selective upregulation of endothelin converting enzyme-1a in the human failing heart. *J Card Fail* 6:314–20
 146. Kawaguchi H, Sawa H, Yasuda H (1990) Endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 22:839–42

147. Cao LQ, Banks RO (1990) Cardiorenal actions of endothelin, Part I: Effects of converting enzyme inhibition. *Life Sci* 46:577–83
148. Boarder MR, Marriott DB (1989) Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5:S223–4
149. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, Shichiri M, Marumo F (1991) Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 18:165–70
150. Russell FD, Molenaar P (2000) The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol Sci* 21:353–9
151. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F (1991) Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69:209–15
152. Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR (1990) Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 265:20555–62
153. Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, et al (2005) Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun* 73:2496–503
154. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M (1993) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92:398–403
155. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1996) Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384:353–5
156. Cullingford TE, Markou T, Fuller SJ, et al (2008) Temporal regulation of expression of immediate early and second phase transcripts by endothelin-1 in cardiomyocytes. *Genome Biol* 9:R32
157. Filtz TM, Grubb DR, McLeod-Dryden TJ, Luo J, Woodcock EA (2009) Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase C β 1b. *FASEB J* 23:3564–70
158. Choukroun G, Hajjar R, Kyriakis JM, Bonventre J V, Rosenzweig A, Force T (1998) Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 102:1311–20
159. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F (1989) Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78:225–8

160. Chen S, Evans T, Mukherjee K, Karmazyn M, Chakrabarti S (2000) Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors. *J Mol Cell Cardiol* 32:1621–9
161. Shehadeh A, Regan TJ (1995) Cardiac consequences of diabetes mellitus. *Clin Cardiol* 18:301–5
162. Bell DSH (2003) Heart failure: the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. *Diabetes Care* 26:2433–41
163. Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 14:397–412
164. Piper H, Volz A (1990) Adult ventricular rat heart muscle cells. *Cell Cult. Tech. Hear. Vessel Res.* pp 158 – 177
165. Schlüter K-D, Schreiber D (2005) Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol Biol* 290:305–14
166. Volz A, Piper HM, Siegmund B, Schwartz P (1991) Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 23:161–73
167. Langer M, Lüttecke D, Schlüter K-D (2003) Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflugers Arch* 447:289–97
168. Scientific Instruments Bedienungsanleitung.
169. Arndt T (2012) Chemolumineszenz. In: Gressner A, Arndt T (eds) *Lex. der Medizinischen Lab.*, 2nd ed. Springer-Verlag, p 320
170. 345818 | RapidStep™ ECL Reagent.
http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/RapidStep%E2%84%A2-ECL-Reagent,EMD_BIO-345818. Accessed 4 Apr 2015
171. Chung KY, Kang M, Walker JW (2008) Contractile regulation by overexpressed ETA requires intact T tubules in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2391–9
172. Kang M, Walker JW (2006) Endothelin-1 and PKC induce positive inotropy without affecting pHi in ventricular myocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:865–70
173. Kelly RA, Eid H, Krämer BK, O'Neill M, Liang BT, Reers M, Smith TW (1990) Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Clin Invest* 86:1164–71
174. Goldberg AT, Bond BR, Mukherjee R, New RB, Zellner JL, Crawford FA, Spinale FG (2000) Endothelin receptor pathway in human left ventricular myocytes: relation to contractility. *Ann Thorac Surg* 69:711–5; discussion 716

175. Kelso EJ, McDermott BJ, Silke B, Spiers JP (2000) Endothelin(A) receptor subtype mediates endothelin-induced contractility in left ventricular cardiomyocytes isolated from rabbit myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 294:1047–52
176. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P (1985) The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 17:1029–42
177. Pribnow D, Muldoon LL, Fajardo M, Theodor L, Chen LY, Magun BE (1992) Endothelin induces transcription of fos/jun family genes: a prominent role for calcium ion. *Mol Endocrinol* 6:1003–12
178. Piihola J, Mäkinen M, Szokodi I, Ruskoaho H (2003) Dual role of endothelin-1 via ETA and ETB receptors in regulation of cardiac contractile function in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H112–8
179. Nishimaru K, Miura Y, Endoh M (2007) Mechanisms of endothelin-1-induced decrease in contractility in adult mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 152:456–63
180. Mullan DM, Bell D, Kelso EJ, McDermott BJ (1997) Involvement of endothelin (ET)A and ETB receptors in the hypertrophic effects of ET-1 in rabbit ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 29:350–9
181. Cullen JP, Bell D, Kelso EJ, McDermott BJ (2001) Use of A-192621 to provide evidence for involvement of endothelin ET(B)-receptors in endothelin-1-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Eur J Pharmacol* 417:157–68
182. Chen S, Khan ZA, Karmazyn M, Chakrabarti S (2007) Role of endothelin-1, sodium hydrogen exchanger-1 and mitogen activated protein kinase (MAPK) activation in glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Diabetes Metab Res Rev* 23:356–67
183. Post GR, Goldstein D, Thuerauf DJ, Glembotski CC, Brown JH (1996) Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 271:8452–7
184. Ramirez MT, Sah VP, Zhao XL, Hunter JJ, Chien KR, Brown JH (1997) The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 272:14057–61
185. Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC (1997) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol* 139:115–27
186. Pönicke K, Schlüter KD, Heinroth-Hoffmann I, Seyfarth T, Goldberg M, Osten B, Piper HM, Brodde OE (2001) Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only alpha1A-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364:444–53

187. Brooksby P, Levi AJ, Jones J V (1992) Contractile properties of ventricular myocytes isolated from spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 10:521–7
188. Karam H, Heudes D, Bruneval P, Gonzales MF, Löffler BM, Clozel M, Clozel JP (1996) Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension* 28:379–85
189. Delbridge LM, Morgan TO, Harris PJ (1995) Effects of endothelin-1 on the contractility of cardiomyocytes from the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:755–62
190. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F (1994) Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 89:2198–203
191. Gu XH, Casley DJ, Cincotta M, Nayler WG (1990) 125I-endothelin-1 binding to brain and cardiac membranes from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 177:205–9
192. Lieu AT, Reid JJ (1994) Changes in the responsiveness to endothelin-1 in isolated atria from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 261:33–42
193. Hileeto D, Cukiernik M, Mukherjee S, Evans T, Barbin Y, Downey D, Karmazyn M, Chakrabarti S (2002) Contributions of endothelin-1 and sodium hydrogen exchanger-1 in the diabetic myocardium. *Diabetes Metab Res Rev* 18:386–94
194. Nunoda S, Genda A, Sugihara N, Nakayama A, Mizuno S, Takeda R (1985) Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels* 1:43–7
195. Nuwayri-Salti N, Karam CN, Al Jaroudi WA, Usta JA, Maharsy WM, Bitar KM, Bikhazi AB (2007) Effect of type-1 diabetes mellitus on the regulation of insulin and endothelin-1 receptors in rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol* 85:215–24
196. Vesci L, Mattera GG, Tobia P, Corsico N, Calvani M (1995) Cardiac and renal endothelin-1 binding sites in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 32:363–7
197. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977–86
198. King GL, Brownlee M (1996) The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25:255–70
199. Koya D, King GL (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47:859–66

11 Anhang

11.1 Übersicht über mögliche Ätiologien der Herzinsuffizienz

Ohne Anspruch auf Vollständigkeit, teilweise mit Überlappungen, modifiziert nach [1].

Erkrankungen des Myokards

1. Koronare Herzkrankheit
2. Arterielle Hypertonie
3. Cardiomyopathie (CM)
 - a. Familiär (hypertrophe, dilatative, restriktive CM, ARVCM)
 - b. Erworben
 - i. Myokarditis
 1. Infektiös (bakteriell, viral, fungal)
 2. (Auto-)immunvermittelt
 3. Toxisch (Medikamente, Alkohol, Schwermetalle)
 - ii. Endokrin/Nutritional
 - iii. Schwangerschaft
 - iv. Infiltration (Amyloidose, bösartige Erkrankungen)

Valvuläre Herzkrankheiten

Erkrankungen des Perikards

1. Konstriktive Perikarditis
2. Perikarderguss

Erkrankungen des Endokards

1. Endokarditis (mit und ohne Eosinophilie)
2. Endokardiale Fibroelastose

Vitien

1. Azyanotische Vitien
 - a. Klappenstenosen
 - b. Septumdefekte
 - c. Persistierender Ductus arteriosus

2. Zyanotische Vitien
 - a. Fallot'sche Tetralogie
 - b. Atresien
 - c. Transposition der großen Arterien
 - d. Univentrikuläre Herzen

Arrhythmien

1. Bradykarde Herzrhythmusstörungen
2. Tachykardie Herzrhythmusstörungen

Erkrankungen des Reizleitungssystems

1. Blöcke (SA-, AV-Block)
2. Akzessorische Leitungsbahnen

Situationen mit erhöhtem Bedarf

1. Anämie
2. Sepsis
3. Thyreotoxikose

Volumenüberlastung

1. Niereninsuffizienz
2. Iatrogen

12 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

- Koch C, Uhle F, Wolff M, Arens C, Schulte A, Li L, Niemann B, Henrich M, Rohrbach S, Weigand M, Lichtenstern C. Cardiac effects of echinocandins after central venous administration in adult rats. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015 Mar;59(3):1612-9.
- Arens C, Uhle F, Wolff M, Röhrig R, Koch C, Schulte S, Weiterer S, Henrich M, Weigand MA, Schlüter KD, Lichtenstern C. Effects of echinocandin preparations in adult ventricular cardiomyocytes: Early results of an in-vitro study. Anaesthesist. 2014 Feb;63(2): 129 – 34
- Lichtenstern C, Wolff M, Arens C, Klie F, Mahjeed R, Henrich M, Uhle F, Weiterer S, Röhrig R, Weigand MA. Cardiac effects of echinocandin preparations – three case reports. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2013 Oct;38(5):429-31
- Hinrichs S, Heger J, Schreckenber R, Wenzel S, Euler G, Arens C, Bader M, Rosenkranz S, Caglayan E, Schlüter KD. Controlling cardiomyocyte length: The role of renin and PPAR- γ . Cardiovascular Research 2011 Feb 1;89(2):344-52. Epub 2010 Sep 30.

Zeitschriftenbeitrag:

- Arens C, Weigand MA, Kreuder JG. Thieme Teaching Award 2014 – Das „Schwerpunktcurriculum AINS“. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2014; 49: 560–56

Abstracts:

- Arens C, Ahlbrandt J, Neuhaus C, Weigand MA, Röhrig R. PO-1.2.9 Unbeabsichtigte Handlungen beim normalen Gebrauch an Medizinprodukten als Quelle nicht wahrgenommener Gefährdungen - Ein Fallbericht. Anästh Intensivmed 2015;56:S436
- Arens C, Uhle F, Wolff M, Röhrig R, Henrich M, Weigand MA, Schlüter KD, Lichtenstern C. Effects of echinocandin preparations in adult ventricular cardiomyocytes - early results of an in vitro study. Infection, August 2013, Volume 41, Issue 1 Supplement, pp 1-90
- Arens C, Olschewski H, Schermuly R, Schlüter KD. P472 - Einfluss spezifischer Rezeptorantagonisten auf die chronische Endothelinwirkung an ventrikulären Herzmuskelzellen: Bedeutung für Funktion und Wachstum. Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, April 2010

Postervorträge:

- Arens C, Olschewski A, Olschewski H, Schermuly R, Schlüter KD. The influence of specific receptor antagonists on the endothelin-effect of ventricular cardiomyocytes and their relevance for function and growth. Cardiac Physiology & Experimental Cardiology-Congress, 2010.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Mein tiefster Dank gilt – meist überlappend, aber doch jeweils nur einmal erwähnt: Den Lehrenden (Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter, Dr. Rolf Schreckenberger), den Fleißigen (Nadine Woitasky, Peter Volk und Daniela Schreiber), den Verständnisvollen (Mutter, Vater, Schwester, Schwager, Nichte), den Aufbauenden (Nadine, Sebastian), den Nachhakenden (Prof. Dr. Markus Weigand) und den Kontrolleuren (Michael, Frederik, Martin)!